



Etude de Fibrobacter succinogenes en bioréacteur anaérobie en vue de la dégradation de déchets végétaux

Gwendoline Christophe

► To cite this version:

Gwendoline Christophe. Etude de Fibrobacter succinogenes en bioréacteur anaérobie en vue de la dégradation de déchets végétaux. Microbiologie et Parasitologie. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2007. Français. NNT : 2007CLF21761 . tel-00718166

HAL Id: tel-00718166

<https://theses.hal.science/tel-00718166>

Submitted on 16 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
N° d'ordre : 462

Thèse

Présentée à l'université Blaise Pascal
pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Spécialité : Génie des Procédés)

Soutenue le 9 Juillet 2007

GWENDOLINE CHRISTOPHE

**Étude de *Fibrobacter succinogenes* en
bioréacteur anaérobie en vue de la dégradation
de déchets végétaux.**

Président : C. LARROCHE

Rapporteurs : P. STREHAIANO
C. GHOMMIDH

Examineurs : B. LAMAZE
J. BURSENS
C.G. DUSSAP

Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique

A mes parents,

Remerciements

Je remercie Claude Gilles Dussap, professeur à l'Université Blaise Pascal et directeur du Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique de m'avoir accueilli et permis de d'effectuer cette étude dans les meilleures conditions.

J'exprimer ma reconnaissance envers Catherine Creuly pour son aide et ses conseils scientifiques et techniques tout au long de ces trois années de thèse.

J'adresse mes vifs remerciements aux membres du jury, P. Strehaiano, C. Ghommid, B. Lamaze, J. Bursens, C. Larroche et C.G. Dussap, d'avoir pris le temps de juger mon travail.

Je tiens ensuite à remercier Max Mergeay de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, ainsi que Larissa Hendrickx pour son assistance et ses conseils durant mon stage au SCK-CEN (Mol, Belgique).

Je tiens à remercier également l'ensemble des personnes du LGCB pour leur accueil et pour leur contribution au bon déroulement de cette thèse. Je pense notamment à David Duchez pour son aide, ses explications et ses conseils, à Agnès Pons pour son esprit critique dans la rédaction de mon rapport et à Sky pour avoir pris le temps de m'aider à dans les dernières minutes de ma rédaction. Mais également les personnes avec qui j'ai partagé mon bureau et les pauses café ou le « tea time », qui m'ont permis de passer cette thèse dans une bonne ambiance, je pense notamment à Erell, Bérangère, Natacha, Mariline et tous les autres que j'oublie pour leurs conseils pratiques et leur attention dans les moments de stress et de fatigue.

Je tiens à remercier également l'ensemble de ma famille pour m'avoir permis d'arriver jusque là et pour m'avoir soutenu.

Enfin, Je tiens à remercier la personne avec qui je partage ma vie, Toufik, pour son attention et surtout pour la patience dont il a su faire preuve face à mon sale caractère.

Résumé

L'intérêt pour les technologies de biodégradation des déchets végétaux est de plus en plus important, aussi bien d'un point de vue environnemental que de santé publique. Les deux plus importantes technologies de dégradation s'appuyant sur des phénomènes biologiques sont la biométhanogenèse et le compostage. La biotechnologie développée ici s'appuie sur la capacité de dégradation du rumen des bovidés. En effet, les ruminants sont les animaux les plus performants pour dégrader les déchets végétaux grâce à une communauté microbienne très abondante et très efficace. Parmi ces micro-organismes, *Fibrobacter succinogenes* est l'espèce majeure. Elle possède un équipement enzymatique très complet et complexe qui permet de dégrader les végétaux. Ces potentialités peuvent donc être utilisées dans le cadre du développement d'une technologie de biodégradation de déchets végétaux et dans le cadre du projet MELiSSA qui vise à créer un écosystème clos artificiel.

Au cours de ce travail, un réacteur anaérobie a été mis au point pour la culture de *Fibrobacter succinogenes* S85. Dans un premier temps des cultures sur glucose ont été effectuées afin de valider les techniques utilisées. Ces cultures ont montré que notre procédé est valide pour *Fibrobacter succinogenes* mais également que le suivi de la croissance est possible par un suivi de l'augmentation de pression, due à la production de CO₂. Ceci nous permet donc de suivre la croissance dans des milieux plus complexes comme ceux contenant des végétaux.

La dégradation des déchets végétaux par *Fibrobacter succinogenes* a ensuite été effectuée. Le substrat est composé de chou, de tourteau de soja et de paille de blé, en mélange (1/3 de chaque) ou séparément. Ces cultures ont permis de mettre en évidence des cinétiques de dégradation différentes selon le substrat utilisé. L'explication est que la différence de composition des substrats (cellulose, hémicellulose et lignine) provoque, pour les substrats les plus riches en fibres, la synthèse d'enzymes plus spécifiques. Ensuite, la dégradation d'un substrat issue d'une première dégradation par biométhanogenèse, dans le cadre du projet MAP, a été réalisée. Ces cultures ont permis une amélioration du système et ont révélé des rendements de dégradation totaux (boucle MAP) importants.

La recherche d'un contaminant par biologie moléculaire a été menée pour expliquer la production de butyrate dans nos cultures. Les expériences effectuées ne permettent pas de conclure sur la présence d'un contaminant et d'autres expériences doivent être effectuées. Enfin, toutes les fermentations effectuées ont été simulées grâce au programme "Anaerobic Waste Compartment Modelling and Simulation". Ces simulations montrent une très grande similitude avec les résultats expérimentaux et ce programme peut donc être utilisé pour prédire la dégradation de quantités plus importantes de substrat.

Abstract

The interest for biodegradation technologies of vegetation waste is increasingly significant, as well for an environmental point of view than a public health point of view. The two most important biotechnologies for vegetable degradation, based on biological events, are the biomethanogenesis and composting. The biotechnology developed in this study, is based on the efficiency of the rumen to degrade vegetables. Indeed, ruminants are the most efficient animals to degrade vegetable wastes thanks to a microbial community very abundant and very effective. Among these micro-organisms, *Fibrobacter succinogenes* is the major species. It has an enzymatic equipment very complete and complex which explain these capacities to degrade the vegetables. These potentialities can thus be used within the framework of the development of a technology of biodegradation of vegetation wastes and within the framework of the MELiSSA project which aims to create an artificial closed ecosystem.

This study focused on the development of an anaerobic bioreactor for *Fibrobacter succinogenes* S85 cultures. First, cultures on glucose were carried out in order to validate the techniques used. These cultures showed that our process is valid for *Fibrobacter succinogenes* cultures. They also showed a link between VFA production, glucose consumption and gas pressure measurement. So the pressure could be used as a growth parameter especially when growth occurs on vegetables.

The degradation of the vegetation wastes by *Fibrobacter succinogenes* was then performed. The substrate was composed of cabbage, wheat straw and soya bean, in mixture (1/3 of each) or separately. These cultures showed different kinetics of degradation according to the substrate used. The explanation is that the difference in composition of the substrate (cellulose, hemicellulose and lignin) causes, for the substrate richest in fibres, the synthesis of more specific enzymes. Then, the degradation of a substrate from a first degradation by methanogenesis, within the framework of MAP project, was carried out. These cultures allowed an improvement of the system and revealed important total degradation yields (MAP loop).

The presence of a contaminant was verified by molecular biology in order to explain the production of butyrate in our cultures. With these experiments we can't conclude of the presence of a contaminant and other research must be performed.

Finally, all performed fermentations were simulated with the program "Anaerobic Waste Compartment Modelling and Simulation". These simulations show a very great similarity with the experimental results. So this program can be used to predict the degradation of a biggest quantity of substrate.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION..... 15

CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE 23

1	LA STRUCTURE DES PAROIS VEGETALES	25
1.1	Les cellules végétales.....	25
1.1.1	Les plastides et les pigments assimilateurs.....	25
1.1.2	La vacuole	26
1.1.3	La paroi végétale	26
1.2	Constituants des parois	27
1.2.1	La cellulose	27
1.2.2	Les hémicelluloses	29
1.2.3	La lignine	30
1.2.4	Les pectines.....	31
1.2.5	Autres constituants	31
1.3	Organisation des parois.....	32
1.3.1	La paroi primaire.....	32
1.3.2	La paroi secondaire	32
1.3.3	La lamelle moyenne	33
1.3.4	Rôles des parois.....	33
1.4	Dégradation biologique des parois des cellules végétales.....	34
1.4.1	Dégradation de la cellulose.....	34
1.4.2	Dégradation de l'hémicellulose	35
1.4.3	Dégradation de la lignine.....	36
1.4.4	Dégradation des pectines	36
1.5	Conclusion	38
2	PROCEDES DE DEGRADATION DES PAROIS VEGETALES	39
2.1	Introduction.....	39
2.2	Le compostage	39
2.2.1	Aspects généraux.....	39
2.2.2	Les différentes technologies de compostage.....	43
2.2.3	Efficacité des procédés de compostage	46
2.3	La méthanogenèse.....	47
2.3.1	Aspects généraux.....	47
2.3.2	Les technologies de méthanogenèse	50
2.3.3	Efficacité des procédés de méthanogenèse.....	52
2.4	Dégradation enzymatique	53
2.4.1	Utilisation des cellulases	53
2.4.2	Technologies utilisant les cellulases	54
2.5	Conclusion	56
3	LE RUMEN	57
3.1	Introduction.....	57
3.2	Aspects généraux	57
3.3	Communauté de micro-organismes dans le rumen	58
3.3.1	Les bactéries.....	59
3.3.2	Les protozoaires	59
3.3.3	Les champignons.....	60
3.4	Dégradation des parois végétales dans le rumen	60
3.4.1	Micro-organismes fibrolytiques et enzymes.....	61
3.4.2	Les champignons du rumen.....	62
3.4.3	Efficacité de dégradation.....	63
3.5	Technologies utilisant les micro-organismes du rumen	64
3.6	Conclusion	67
4	FIBROBACTER SUCCINOGENES.....	68

4.1	Introduction.....	68
4.2	Aspects généraux	68
4.3	Exigences de croissance.....	69
4.4	Adhésion au substrat.....	70
4.5	Métabolisme des sucres simples	72
4.5.1	Aspects généraux.....	72
4.5.2	Transport des sucres	72
4.5.3	La voie Embden-Meyerhof-Parnas (Figure I.20).....	73
4.5.4	Formation de l'acétate.....	75
4.5.5	Formation du succinate.....	76
4.5.6	Formation du formiate.....	78
4.5.7	Stockage du glycogène	78
4.6	Dégradation des substrats lignocellulosiques : activité cellulolytique	80
4.6.1	Les cellulases.....	80
4.6.2	Les hémicellulases.....	84
4.6.3	Mode d'action et localisation des enzymes	86
4.7	Conclusion	87
5	UTILISATION DE <i>FIBROBACTER SUCCINOGENES</i> DANS LE CONTEXTE MELISSA.....	88
5.1	Introduction.....	88
5.2	Généralités	88
5.3	Le concept MELISSA.....	89
5.4	Fibrobacter succinogenes dans MELISSA	92
5.4.1	Le compartiment I	92
5.4.2	Le projet MAP.....	95
5.5	Conclusion	101

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES 103

1	INTRODUCTION.....	105
2	CONDITIONS DE CULTURE.....	106
2.1	Description de la souche	106
2.2	Définition des milieux de culture.....	106
2.3	Source de carbone	108
2.3.1	En Erlenmeyer.....	108
2.3.2	En bioréacteur ou en réacteur RUSITEC.....	108
3	MISE EN CULTURE DE LA SOUCHE.....	110
3.1	En fiole Erlenmeyer	110
3.2	En bioréacteur	110
3.2.1	Le bioréacteur.....	110
3.2.2	Préparation du bioréacteur.....	114
3.3	En réacteur RUSITEC (RUMen SIMulation TECHnique).....	115
3.3.1	Le réacteur.....	115
3.3.2	Préparation du réacteur.....	118
4	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE LA PHASE LIQUIDE	119
4.1	Poids secs.....	119
4.2	Dosage des métabolites.....	119
4.3	Dosage des ions ammonium	120
4.4	Mesure de la quantité de Na ₂ CO ₃ ajoutée	120
5	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE LA PHASE SOLIDE.....	121
5.1	Mesure de la dégradation des végétaux.....	121
5.2	Analyses élémentaires.....	122
5.3	Composition en fibres.....	122
6	MODELISATION	126
6.1	Le programme de simulation et de modélisation	126
6.1.1	Définition des composés.....	127
6.1.2	Définition des équilibres.....	127
6.1.3	Choix du nombre de réactions et du modèle.....	128
6.1.4	Calcul des rendements massiques.....	130
7	RECHERCHE DE CONTAMINANTS PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE	133
7.1	Démarche expérimentale.....	133

7.2	Les milieux de cultures	134
7.3	Extraction d'ADN.....	134
7.4	PCR (Polymerase chain reaction)	135
7.5	DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)	136
7.6	Le séquençage.....	137
8	RECAPITULATIF DES EXPERIENCES	139
9	RECAPITULATIF.....	141

CHAPITRE III

VALIDATION DU PROCEDE ET DES METHODES DE CARACTERISATION DES CULTURES..... 143

1	INTRODUCTION.....	145
2	DETERMINATION DU TAUX DE CROISSANCE ET ESTIMATION DU POIDS SEC.....	148
2.1	Détermination du taux de croissance	148
2.2	Corrélation DO poids sec.....	150
3	ANALYSE D'UNE CULTURE SUR GLUCOSE EN BIOREACTEUR.....	151
3.1	Résultats expérimentaux pour une culture en batch sur glucose	151
3.2	Analyse des bilans matière.....	156
3.3	Analyse stoechiométrique de la culture de référence sur glucose	158
3.3.1	Analyse stoechiométrique de la phase de maintenance	159
3.3.2	Analyse stoechiométrique de la croissance cellulaire.....	162
3.4	Analyse cinétique de la phase de croissance et de la phase de maintenance	163
3.4.1	Analyse cinétique de la phase de maintenance	163
3.4.2	Analyse cinétique de la phase de croissance.....	163
3.5	Simulation.....	165
3.6	Discussion.....	167
4	ANALYSE DE DEUX CULTURES EN FED-BATCH TYPQUES D'UN COMPORTEMENT NON AXENIQUE.....	170
4.1	Réacteur 1	170
4.1.1	Analyse des résultats expérimentaux.....	170
4.1.2	Interprétation et discussion des résultats sur le réacteur 1	174
4.2	Réacteur 2	175
4.2.1	Présentation des résultats expérimentaux	175
4.2.2	Interprétation et discussion des résultats sur le réacteur 2	178
5	DISCUSSION.....	181
6	CONCLUSION ET RECAPITULATION	183

CHAPITRE IV

DEGRADATION DES VEGETAUX..... 185

1	INTRODUCTION.....	187
2	RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	188
2.1	Détermination des temps de séjour nécessaires à la dégradation des particules solides.....	188
2.2	Dégradation des végétaux séparément en bioréacteur.....	190
2.2.1	Dégradation de la paille.....	190
2.2.2	Dégradation de tourteau de soja en bioréacteur	192
2.2.3	Dégradation de chou en bioréacteur	194
2.3	Dégradation du mélange de végétaux en bioréacteur.....	196
3	MODELISATION DE LA DEGRADATION DES VEGETAUX.....	201
3.1	Analyse stoechiométrique	201
3.2	Simulation de la dégradation des végétaux séparément	202
3.3	Simulation de la dégradation du mélange de végétaux	203
4	DISCUSSION.....	205
5	CONCLUSIONS	210

CHAPITRE V

DEGRADATION DU SUBSTRAT MAP	211
1 INTRODUCTION.....	213
2 RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	215
2.1 Influence du temps de séjour du solide	215
2.2 Ajout du substrat solide en fed-batch	215
2.3 Culture en batch	219
2.4 Renouvellement du milieu de culture.....	222
2.4.1 Expériences préliminaires sur glucose.....	223
2.4.2 Dégradation du substrat MAP en utilisant une technique de renouvellement du milieu de culture...	232
3 SIMULATION.....	237
3.1 Ajout du substrat solide en fed-batch	237
3.2 Culture en batch	238
3.3 Dégradation du substrat MAP en utilisant une technique de renouvellement du milieu de culture	239
3.4 Simulation de la boucle MAP	240
3.4.1 La boucle MAP	240
3.4.2 Simulation	241
4 DISCUSSION.....	243
5 CONCLUSIONS	245

CHAPITRE VI

RECHERCHE DE CONTAMINANTS	247
1 INTRODUCTION.....	249
2 RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	250
2.1 Identification globale des espèces présentes	250
2.2 Analyse de la diversité microbienne des prélèvements	252
2.3 Identification des contaminants cultivables	254
3 DISCUSSION.....	258
4 CONCLUSION	262

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	263
---	------------

ABRÉVIATIONS	271
---------------------------	------------

REFERENCES	275
-------------------------	------------

ANNEXES	295
----------------------	------------

<i>Annexe 1 : Circuit gaz du RUSITEC</i>	<i>297</i>
<i>Annexe 2 : Protocole d'inoculation du RUSITEC</i>	<i>298</i>
<i>Annexe 3 : Protocole de prélèvement du RUSITEC</i>	<i>299</i>
<i>Annexe 4 : Milieux de culture pour la recherche de contaminants</i>	<i>300</i>
<i>Annexe 5 : Amorces utilisées</i>	<i>301</i>

PUBLICATIONS.....	303
--------------------------	------------

INTRODUCTION

En France, la production de déchets est de 850 millions de tonnes en 2005 et 43% de ces déchets sont issus de l'agriculture et de la sylviculture (ADEME, 2006). L'augmentation continue de la production de déchets végétaux s'inscrit aussi bien dans une problématique environnementale que de santé publique. Pendant longtemps, ces déchets ont été stockés en décharges, solution pratique et peu coûteuse. Cependant cette solution présente des inconvénients comme la dispersion d'odeurs, la formation de niches pour des micro-organismes pathogènes, l'occupation d'étendues vastes pour leur stockage...etc.

Pour ces raisons, il existe un intérêt croissant pour les technologies de dégradation biologiques des déchets afin de les recycler en biofertilisants ou en biocarburants. Bien que les procédés qui utilisent les micro-organismes soient utilisés depuis des centaines d'années dans l'industrie agro-alimentaire, leur utilisation dans le domaine de l'environnement pour le traitement et la valorisation des déchets végétaux, n'est que très récente. Pourtant, ces déchets végétaux peuvent représenter une ressource potentielle pour la production d'énergie renouvelable par conversion biologique. Ainsi, la dégradation de la matière organique par des traitements biologiques avec la valorisation des sous-produits obtenus tend à se développer au détriment de la combustion et de la mise en décharge. Elle se trouve favorisée par l'accroissement du tri sélectif et de la volonté politique de recycler les déchets. Les produits obtenus sous forme solide ou gazeuse, présentent une valeur marchande. Sous forme solide, ils sont utilisés comme amendement, doivent répondre à des normes sanitaires et s'insérer dans un marché. Quant aux biogaz, ils sont soit transportés dans le réseau de gaz (cas de la Hollande), soit brûlés en chaudière pour fournir de la vapeur, soit destinés à alimenter des générateurs électriques ou des véhicules (autobus de Lille).

Les études concernant les technologies de biodégradation montrent trois approches : l'une aérobie comme le compostage et l'autre anaérobie telle que la méthanogenèse. Il existe enfin une approche enzymatique par utilisation des cellulases microbiennes. Dans les deux premières approches, les technologies développées sont basées sur des phénomènes naturels de décomposition de la matière organique.

Le compostage est un processus naturel au cours duquel un grand nombre d'espèces de micro-organismes se développent sur les déchets organiques en se nourrissant de sucres, de

protéines, de cellulose et d'autres constituants des matières organiques. Le but des méthodes de compostage est de rendre les conditions environnementales favorables afin d'optimiser la croissance des différents groupes de micro-organismes pour améliorer la dégradation des déchets végétaux et augmenter la quantité des produits finaux valorisables.

La méthanogenèse est un procédé microbiologique anaérobie qui permet de dégrader de façon progressive la matière organique en compost, méthane et dioxyde de carbone grâce à une communauté bactérienne très organisée. Ce procédé permet à la fois de traiter la matière organique et de générer une énergie renouvelable : le biogaz. La restitution de la matière organique au sol après dégradation par méthanisation thermophile en réacteur garantit des conditions d'hygiénisation correctes.

L'utilisation des cellulases et des hémicellulases microbiennes est largement répandue dans différentes activités industrielles, comme dans l'industrie du textile, des détergents ou de la brasserie, mais également dans le traitement des déchets domestiques et le traitement biologique de l'alimentation végétale du bétail non ruminant. L'action des cellulases et des hémicellulases consiste à dégrader les macromolécules hydrocarbonées, généralement la cellulose ou ses dérivés, en molécules simples (oses, diholosides) qui peuvent être assimilées pour des transformations ultérieures, qu'il s'agisse de processus digestifs pour l'alimentation animale, ou de procédés de valorisation des déchets.

En comparaison, les ruminants possèdent dans leur rumen les micro-organismes capables d'hydrolyser les polysides des parois végétales en sucres assimilables par l'animal et n'ont donc pas besoin d'un ajout d'enzymes cellulolytiques dans leur alimentation. De ce fait, le mode de digestion des ruminants représente le procédé de dégradation biologique naturel le plus performant.

De façon très générale, ce travail vise à caractériser et à reproduire en bioréacteur la dégradation de fibres végétales à partir de bactéries du rumen à des fins de valorisation de déchets végétaux.

Le rumen est l'un des quatre compartiments prégastriques des ruminants. Les aliments ingérés par les ruminants sont dégradés grâce à une communauté microbienne dense et diversifiée qu'ils hébergent dans leur rumen, sorte de fermenteur préstomacal. C'est dans cet organe, après mastication et imprégnation de salive, que sont dégradés puis fermentés les polysides des parois végétales. La dégradation dans le rumen fournit l'énergie nécessaire à la croissance

des micro-organismes et des acides gras volatils qui sont la source principale d'énergie du ruminant. Les agents microbiens du rumen qui dégradent et fermentent les polysides pariétaux des végétaux appartiennent aux trois communautés microbiennes majeures : les bactéries, les protozoaires et les champignons essentiellement anaérobies stricts. La dégradation des végétaux se fait dans le rumen par des interactions complexes et diversifiées entre ces différents micro-organismes et grâce à un ensemble d'enzymes qui dégrade les différents polymères et les liaisons entre ces polymères (Fonty et Forano, 1999).

La flore bactérienne est la plus performante pour digérer la cellulose. Cependant toutes les espèces bactériennes retrouvées dans le rumen ne sont pas capables de dégrader la cellulose et l'hémicellulose. *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*, compte tenu de leur concentration dans le rumen (10^{10} - 10^{11} cellules.mL⁻¹) (Fonty et Forano, 1999) et de leur aptitude à hydrolyser la cellulose purifiée et la cellulose des fourrages, sont les principales bactéries cellulolytiques du rumen.

Fibrobacter succinogenes est la bactérie la plus efficace. La raison principale de cette efficacité est que cette bactérie possède un équipement enzymatique spécifique pour dépolymériser les parois des cellules végétales. Cet équipement contient des cellodextrinases, des cellobiosidases, des endogluconases, des exogluconases, des cellulases, des xylanases et des estérases. Leurs modes d'action sont différents mais elles peuvent agir en synergie afin de dégrader des polymères pariétaux de façon optimale (Forsberg *et al.*, 1984). Après une adhérence très étroite avec les parois des cellules végétales (Fields *et al.*, 2000), la cellulose est dépolymérisée sur la surface bactérienne par différentes cellulases et cellodextrinases pour libérer des cellodextrines qui seront hydrolysées en glucose et cellobiose dans le périplasme (Huang et Forsberg, 1987). Le glucose et le cellobiose sont alors fermentés en succinate, acétate, CO₂ et en une quantité faible de formiate (Bryant et Burkey, 1953).

Du fait de ces potentialités importantes vis-à-vis des cellules végétales, les cultures de *Fibrobacter succinogenes* peuvent être une alternative intéressante pour le développement de procédés biologiques destinés au traitement des déchets végétaux. Il s'agit là d'un cadre de travail très vaste qui a été à l'origine du financement de cette thèse.

Plus précisément, ce sujet a suscité l'intérêt de l'Agence Spatiale Européenne. Dans un concept d'écosystème clos pour des missions spatiales de longues durées, comme le projet

MELiSSA (Micro-Ecological Life Support Alternative) soutenu par l'Agence Spatiale Européenne, il est nécessaire de subvenir aux besoins en eau, en oxygène et en nourriture de l'équipage en recyclant les déchets produits. Ceci ne peut être réalisé qu'en incluant dans la boucle de recyclage un « compartiment » de production de plantes supérieures. On montre alors que plus de 70% de la masse des déchets solides produits proviennent des plantes supérieures. La capacité de dégradation des végétaux est donc un enjeu majeur. Elle doit être effectuée par un processus biologique afin d'utiliser les produits de la dégradation dans l'écosystème artificiel et fabriquer les molécules qui servent de substrats pour cultiver les végétaux.

C'est donc dans cette optique de dégradation de déchets végétaux que s'inscrit le travail présenté. En effet, la connaissance acquise au cours de ce travail doit s'appliquer à la mise en place d'un compartiment alternatif (MAP : Microgravity Application Programme) au compartiment liquéfacteur de l'écosystème MELiSSA, mais plus généralement peut aussi s'avérer utile dans la mise en place de procédés biologiques de dégradation de déchets végétaux utilisant *Fibrobacter succinogenes*.

Cette thèse s'articule en six chapitres :

Dans le premier chapitre, « étude bibliographique » plusieurs points seront traités : la structure des parois végétales ainsi que les enzymes nécessaires à sa dégradation, les technologies de biodégradation des déchets végétaux, le rumen, *Fibrobacter succinogenes* la bactérie la plus performante de l'écosystème rumen et l'intégration de cette bactérie au sein du projet d'écosystème clos MELiSSA.

Dans le deuxième chapitre, les méthodes expérimentales et les matériels utilisés au cours de cette étude seront décrits.

Le troisième chapitre sera consacré à la validation du procédé de fermentation utilisant *Fibrobacter succinogenes* par le biais de cultures sur glucose en bioréacteur anaérobie.

Les résultats expérimentaux et les simulations de cultures en bioréacteur de *Fibrobacter succinogenes* sur différents substrats végétaux ainsi que leurs interprétations, seront présentés dans le quatrième chapitre.

Le chapitre 5 sera consacré à l'optimisation de la dégradation d'un substrat issu d'une première étape de dégradation par méthanogenèse ainsi qu'à la simulation des cultures effectuées.

Enfin, dans le dernier chapitre, les résultats de la recherche de contaminants dans les cultures, seront présentés.

CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 LA STRUCTURE DES PAROIS VEGETALES

1.1 Les cellules végétales

La cellule végétale (Figure I.1) se distingue de la cellule animale par trois caractéristiques cytologiques majeures : les plastes et pigments assimilateurs, la vacuole et la paroi.

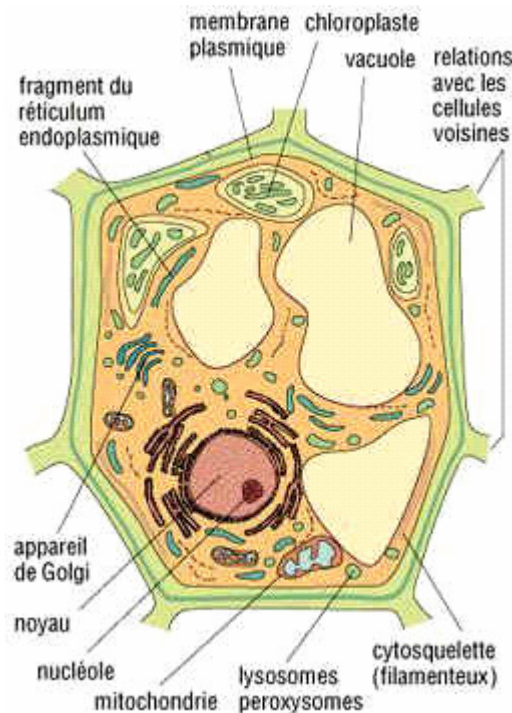


Figure I.1 : Shéma d'une cellule végétale (Référence internet 1).

1.1.1 Les plastes et les pigments assimilateurs

Les plastes sont des organites limités par deux membranes. Ils dérivent tous de proplastides et sont de deux types : les leucoplastes et les chromoplastes. Les leucoplastes sont dépourvus de pigments, tels les amyloplastes qui accumulent de l'amidon, substance de réserve. Les chromoplastes, en particulier les chloroplastes, dont les pigments sont les chlorophylles et les caroténoïdes, assurent l'absorption de l'énergie solaire. Les chlorophylles *a* sont capables de réaliser la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique grâce à la réaction photosynthétique. Les caroténoïdes confèrent à certains organes leur couleur jaune, orangé ou rouge.

1.1.2 La vacuole

La vacuole est très importante chez les végétaux, elle occupe 80 à 90% du volume cellulaire. Les cellules jeunes possèdent plusieurs petites vacuoles alors que les cellules adultes se caractérisent par une vacuole unique. Elle contient le suc vacuolaire dont la composition varie en fonction de l'état de la plante. En général, son rôle est dédié au stockage de l'eau, de solutés organiques, d'ions minéraux et parfois de pigments (anthocyanes). La vacuole joue donc un rôle majeur dans la régulation des grandes fonctions physiologiques de la cellule végétale (pH, pression osmotique, concentrations ioniques,...etc.).

1.1.3 La paroi végétale

La paroi est l'enveloppe la plus externe de la cellule végétale. Elle est essentiellement composée de polymères glucidiques, cellulose et pectine, de protéines pariétales et éventuellement d'autres composés de nature phénolique (lignine et subérine). La paroi est composée de trois parties (Figure I.2) :

- la paroi primaire, de nature pecto-cellulosique, n'existe seule que dans les cellules juvéniles ; elle est extensible, ce qui permet la croissance cellulaire,
- la paroi secondaire apparaît lors de la différenciation cellulaire. Elle permet de renforcer la rigidité de la cellule et de l'imperméabiliser. Elle est subdivisée en trois sous-couches : S1 (externe), S2 (médiane) et S3 (interne),
- la lamelle moyenne est la partie la plus externe de la paroi et elle est commune à deux cellules contiguës.

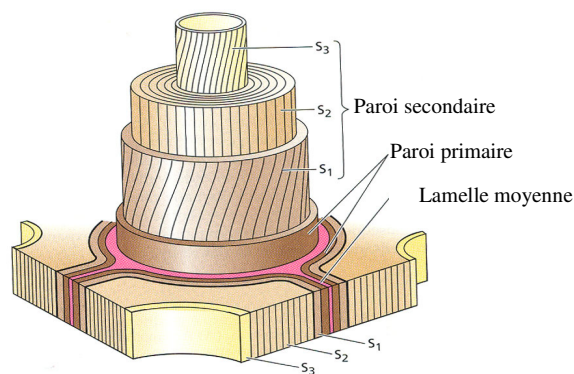


Figure I.2 : Organisation de la paroi végétale d'après Béguin et Aubert (1994).

La paroi assure le maintien et définit la taille et la forme de la cellule végétale. Elle participe à la régulation des relations avec les autres cellules et avec l'extérieur. De manière passive, elle contribue au transport, à l'absorption et à la sécrétion de multiples substances. Pour permettre les communications entre cellules, directement de cytoplasme à cytoplasme, les parois sont finement ponctuées de plasmodesmes.

1.2 Constituants des parois

Les parois contiennent toutes les mêmes constituants de base : eau, cellulose, hémicellulose, lignine, protéines (enzymes, glycoprotéines de structure), substances pectiques, substances inorganiques d'incrustation (CaCO_3 , silicates, oxalates), substances lipophiles d'incrustation (cires, cutine, subérine). Cependant la composition varie selon l'espèce ; dans une même espèce elle est variable selon le tissu et selon l'étape de développement. En effet, la proportion des parois végétales et leur degré de lignification augmentent avec l'âge de la plante.

1.2.1 La cellulose

La cellulose est la molécule renouvelable la plus abondante à la surface de la terre, elle représente plus de la moitié de la biomasse terrestre et est le matériau recyclable le plus exploité dans l'industrie. La cellulose est un glucide, polymère du glucose de formule $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ (n est compris entre 200 et 3000).

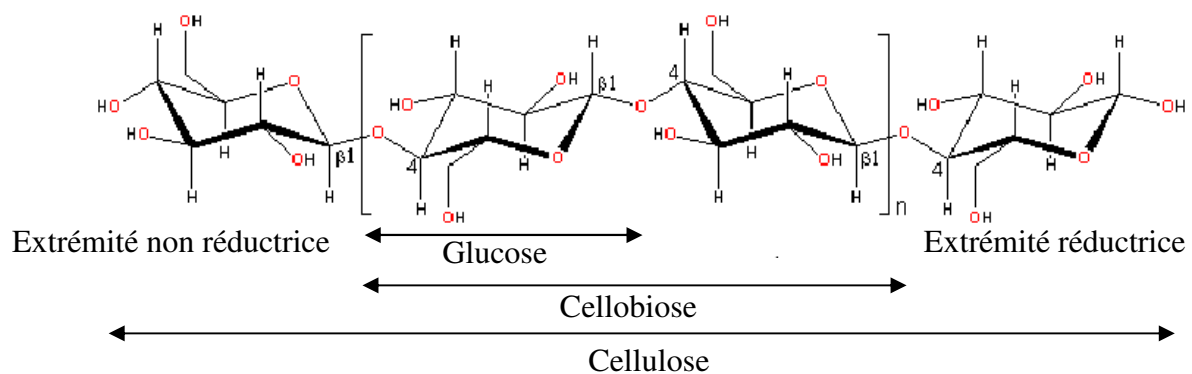


Figure I.3 : Structure de la molécule de cellulose.

La cellulose est constituée d'une chaîne linéaire de molécules de glucose reliées entre elles par des liaisons β -1,4-glucosidiques arrangées en structure microcristalline. L'unité de base est le cellobiose (Figure I.3). La molécule de cellulose est monotone, insoluble, orientée et possède donc une extrémité réductrice et une extrémité non réductrice. Cette polarité de la molécule de cellulose est très importante car l'extrémité non réductrice est le site d'action des enzymes qui catalysent l'allongement de la molécule mais aussi le site d'action d'enzymes qui la dégradent.

L'association linéaire et parallèle de plusieurs molécules de cellulose forme des faisceaux micellaires ou fibrilles dont la cohésion est assurée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires. Ces éléments forment des fibres élémentaires, elles-mêmes agrégées pour former une microfibrille dont le diamètre est compris entre 20 et 30 nm. Les microfibrilles peuvent elles-mêmes s'assembler en macrofibrilles (Figure I.4) formant une structure très ordonnée (Haigler, 1985).

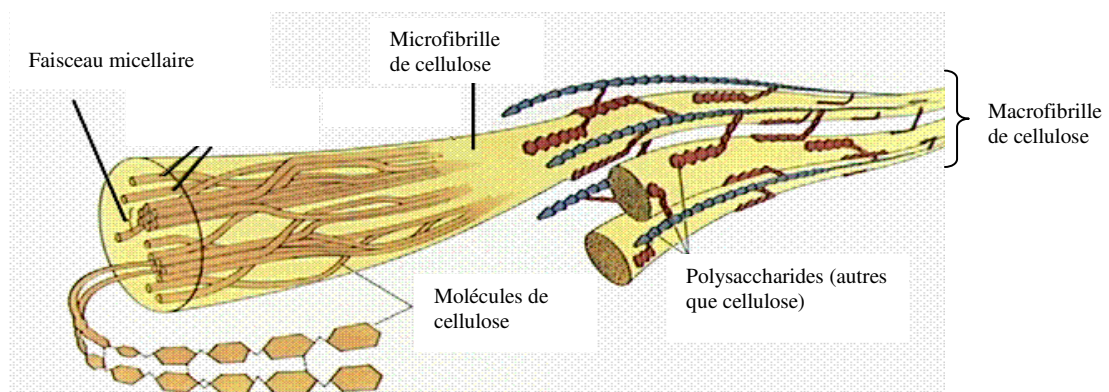


Figure I.4 : Les différents niveaux d'organisation de la cellulose (Référence internet 2).

Des liaisons hydrogènes intermoléculaires favorisent l'organisation des chaînes parallèles en domaines cristallins appelés cristallites. La régularité de la structure favorise la formation de réseaux cristallins. Ces régions très cristallines, difficilement dégradables par les organismes cellulolytiques (Chesson, 1982) sont séparées par des régions amorphes que les enzymes hydrolysent plus facilement. Le degré de cristallinité de la cellulose est variable. Il est faible dans les cellules jeunes (parois primaires) et peut atteindre 70% dans les cellules matures (parois secondaires).

Les fibres de cellulose peuvent s'agencer entre elles de façon parallèle ou antiparallèle, cette dernière forme étant la plus stable d'un point de vue thermodynamique. Il existe donc deux formes de cellulose (Figure I.5) :

- la cellulose I (parallèle, métastable) est la seule produite par voie biologique et donc la seule présente dans les parois végétales,
- la cellulose II (antiparallèle, stable) est formée par traitement alcalin de la cellulose I qui provoque une rupture des liaisons hydrogènes. Les fibres se réorganisent irréversiblement de façon antiparallèle (Leschine, 1995 ; Tomme *et al.*, 1995a), atteignant ainsi l'état thermodynamique le plus stable.

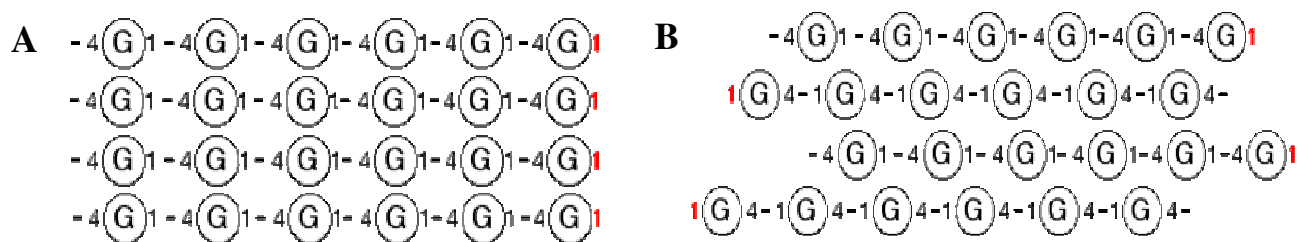


Figure I.5 : Association des molécules de cellulose, A : Association parallèle de molécules de cellulose, B : Association antiparallèle.

1.2.2 Les hémicelluloses

Les hémicelluloses, contrairement à la cellulose, sont des hétéropolymères amorphes composés d'hexoses (glucose, mannose, galactose) et surtout de pentoses (xylose, arabinose). Elles constituent donc une chaîne de β -glucose liée en 1,4 avec de courtes chaînes latérales de xylose, galactose, mannose. Ces chaînes latérales peuvent être méthylées ou acétylées et jouent un rôle important dans la flexibilité et la plasticité des parois végétales. Les hémicelluloses peuvent être de type homopolymère (D-xylane, D-mannane,...etc.) ou hétéropolymère (xyloglucane, glucomannane,...etc.).

Les chaînes de ces macromolécules sont relativement courtes. Elles constituent une matrice polysaccharidique souvent associée à des constituants phénoliques qui entourent les fibrilles de la cellulose (Thomson, 1983). La classe la plus fréquente correspond aux xyloglucanes. Ils sont constitués d'une chaîne de glucose (β -1,4) et de courtes chaînes latérales de xylose, galactose et fucose (Figure I.6).

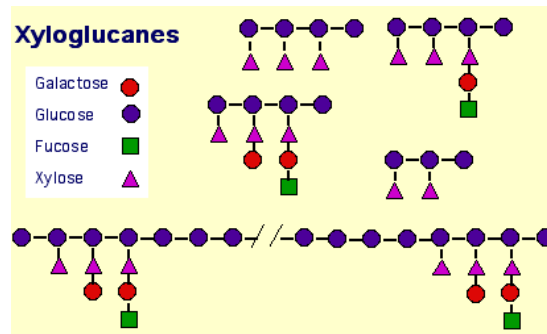


Figure I.6 : Molécules de xyloglucane.

Les xyloglucanes peuvent contracter des liaisons hydrogènes avec la cellulose. A cause de la présence de chaînes latérales, ils ne sont pas eux-mêmes susceptibles de constituer des fibrilles. Ils peuvent ainsi jouer un rôle fondamental dans le maintien d'une architecture pariétale organisée en liant les fibrilles de cellulose entre elles.

1.2.3 La lignine

La lignine est un hétéropolymère phénolique ramifié de haute masse moléculaire, qui résulte de la copolymérisation de trois monomères : alcool coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique. Elle est liée aux hémicelluloses mais les liaisons lignine/hémicelluloses ne sont pas connues avec précision. L'organisation s'effectue autour des microfibrilles de cellulose et aboutit à un treillis dense (Angelidaki *et al.*, 2000). La structure aléatoire en trois dimensions incruste la matrice d'hydrates de carbone en lui conférant davantage de résistance mécanique et de rigidité. En même temps, la paroi devient plus hydrophobe et les structures glucidiques sont moins accessibles aux enzymes exogènes. Ainsi la paroi peut mieux résister aux pathogènes. La synthèse de lignine a lieu surtout lors de la formation de la paroi secondaire. Il s'agit d'un constituant difficilement dégradable et peu de micro-organismes possèdent des enzymes capables de l'hydrolyser (Lynd *et al.*, 2002) (Cf. § 1.4.3).

1.2.4 Les pectines

Les pectines constituent un ensemble complexe de glycanes, en partie neutres et de macromolécules, en partie acides. Elles sont constituées d'une chaîne principale (succession d' α -D-galacturoniques liés en 1,4) et de chaînes secondaires branchées (rhamnose, galactose, arabinose). Une association forte peut avoir lieu grâce aux ions calcium et/ou magnésium et former alors un gel. Cette gélification peut s'interrompre et les pectines devenir fluides en absence de ces éléments. Les tissus jeunes en croissance contiennent généralement une grande quantité de pectine alors que les tissus lignifiés ne contiennent que très peu de substance pectinique (Bach-Knudsen, 1997).

1.2.5 Autres constituants

Les parois contiennent d'autres constituants différents des polysaccharides :

- l'eau est présente à un très fort pourcentage car les constituants polysaccharidiques sont hydrophiles,
- la cutine et subérine sont des polyesters constitués d'acides gras en C16 et C18 qui sont également hydroxylés ; la cutine est omniprésente à la surface de chaque plante et la subérine se trouve à la surface des organes souterrains ; ces structures hydrophobes protègent les plantes contre des pathogènes et minimisent la transpiration,
- les ions dont deux jouent un rôle essentiel :
 - le calcium : qui joue un rôle important dans la gélification des pectines,
 - les protons : le pH de la paroi est acide et ce pH joue un rôle important aussi bien dans l'expression de la croissance que comme antagoniste du calcium vis à vis de la gélification des pectines,
- des enzymes très variés : peroxydases, endoxyloglucane transférases, pectines méthyle estérases et pectinases,
- des protéines :
 - de structure : la principale est l'HRGP (Hydroxyprolin Rich GlycoProtein). Ce réseau d'HRGP joue un rôle en fin de croissance ; il bloque les propriétés de plasticité du réseau polysaccharidique,
 - pariétales : ce sont des glycoprotéines riches en hydroxyproline, glycine, proline, sérine ; les mieux caractérisées sont les extensines impliquées dans

l'extensibilité pariétale ; ces protéines sont liées aux microfibrilles de cellulose par des ponts hydrogènes.

1.3 Organisation des parois

1.3.1 La paroi primaire

La paroi primaire est constituée essentiellement d'hémicelluloses, de pectines et de protéines qui constituent une matrice glycoprotéique très hydrophile. La paroi primaire contient une grande quantité d'eau (60-70%) (Raven *et al.*, 2000). Elle contient aussi de la cellulose mais en plus faible quantité (10%). Les microfibrilles de cellulose sont disposées sans ordre ce qui forme un réseau de mailles et donc la charpente de la paroi. Elles sont réunies entre elles par une matrice de pectines et d'hémicelluloses. Cette paroi peut également contenir de la lignine, de la subérine ou de la cutine.

En général, les cellules juvéniles (cellules en division active) n'ont que des parois primaires ; il en est de même pour les cellules adultes impliquées dans des processus métaboliques telles que la photosynthèse, la respiration et la sécrétion.

1.3.2 La paroi secondaire

La paroi secondaire représente la plus grande partie de la biomasse des plantes. Elle est constituée des éléments de la paroi primaire dans lesquels s'est insérée de la lignine. Elle se distingue par une teneur plus élevée en cellulose et en lignine. Elle est principalement constituée de cellulose sous forme de fibrilles, ne comporte pas de protéine et la pectine n'est pas toujours présente. Les espaces inter fibrillaires peuvent être comblés par incrustation de lignine (lignification). La lignification fait perdre à la paroi beaucoup de son élasticité et de sa plasticité et donc sa capacité de croissance. Les microfibrilles de cellulose y sont disposées de façon régulière, décrivant des hélices très redressées. Le sens d'enroulement des hélices change brusquement d'une strate à l'autre, ce qui permet donc de distinguer les trois sous-couches de la paroi secondaire : externe, médiane et interne (séparées par des transitions en arceaux) (Figure I.2).

1.3.3 La lamelle moyenne

C'est la partie la plus externe de la paroi. Elle sépare deux cellules contiguës permettant la cohésion des tissus. Cette séparation entre deux cellules se fait par dépôt de lignine ce qui permet de protéger chaque cellule. C'est la première à se mettre en place lors de la division cellulaire par accumulation de molécules de pectine formant ainsi la plaque cellulaire constituée de matières pectiques.

1.3.4 Rôles des parois

Les parois des cellules végétales ont une double spécificité. Elles doivent être à la fois rigides pour jouer le rôle de maintien, et flexibles/élastiques pour assurer la croissance et la division cellulaire. Ceci est rendu possible par la diversité des rôles joués par la paroi primaire et la paroi secondaire. Ainsi la paroi primaire contribue à la forme des cellules et au maintien de la plante tout en étant déformable et extensible. Elle permet également le soutien mécanique des structures (pression osmotique, croissance en hauteur), la cohésion cellulaire, la protection cellulaire (une barrière de diffusion aux molécules et aux pathogènes), le contrôle hydrique (diminution de la transpiration) et la mise en réserve d'hydrates de carbone. La paroi secondaire lignifiée joue un rôle majeur dans la croissance et le développement des végétaux mais joue également un rôle dans le maintien de la plante et dans la résistance aux stress biotiques et abiotiques.

De plus, les parois des cellules végétales montrent une très grande variabilité dans leur composition chimique, dans leur propriétés physiques (Akin, 1979) mais également dans les stratégies de résistance aux attaques des micro-organismes du rumen (Akin, 1988, 1989). En effet, les différents composants des parois végétales sont reliés entre eux par des liaisons hydrogène, covalentes ou ioniques, formant un réseau compact qui confère aux parois une rigidité ainsi qu'une résistance à la dégradation par des micro-organismes.

1.4 Dégradation biologique des parois des cellules végétales

La dégradation des parois végétales de façon biologique nécessite l'action de différentes enzymes, hydrolysant les chaînes de polymères et les liaisons des polymères entre eux.

1.4.1 Dégradation de la cellulose

La dégradation de la cellulose est une des transformations essentielles de la biosphère. Elle se fait par hydrolyse grâce à des cellulases qui libèrent des oligomères, du cellobiose, ou du glucose. Quelques micro-organismes seulement (certains procaryotes, protozoaires et champignons) peuvent hydrolyser la cellulose. De même les bovins, les termites et les blattes peuvent utiliser la cellulose comme source d'énergie uniquement parce qu'elle est dégradée par les micro-organismes de leur système digestif.

L'hydrolyse complète de la cellulose en glucose nécessite l'action combinée de multiples enzymes (Figure I.7) avec différentes spécificités de substrat.

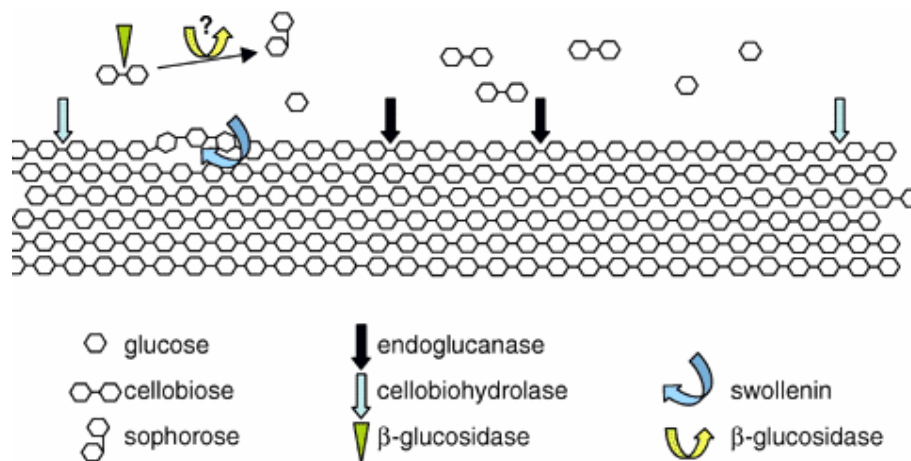


Figure I.7 : Représentation schématique de l'attaque enzymatique de la cellulose d'après Aro *et al.* (2005).

Les cellobiohydrolases ou β -1,4 exoglucanases (EC 3.2.1.91) clivent spécifiquement les liaisons β -1,4 des chaînes de cellulose des extrémités réductrices ou non. Les β -1,4 endoglucanases (EC 3.2.1.4) clivent spécifiquement les liaisons β -1,4 se situant à l'intérieur des chaînes de cellulose, de préférence au niveau des régions amorphes (Teeri, 1997). Les cellodextrinases agissent comme les cellobiohydrolases mais leurs substrats sont des

oligosaccharides ou des cellodextrines. Ces enzymes libèrent du cellotriose ou du cellobiose. Enfin les β -1,4 glucosidases (EC 3.2.1.21) et les cellobiases hydrolysent le cellobiose en glucose qui sert de source de carbone facilement métabolisable (Beguin, 1990). L'action coordonnée de ces enzymes, conduit à l'hydrolyse de la chaîne de cellulose jusqu'à la libération des constituants monomériques.

Un nombre important de gènes codant pour des enzymes dégradant la cellulose ont été isolés de *Trichoderma reesei* (Chen *et al.*, 1987 ; Saloheimo *et al.*, 1994 ; Foreman *et al.*, 2003). De plus des activités cellulolytiques (cellobiohydrolases) ont été caractérisées chez différentes espèces d'*Aspergilli* (Takada *et al.*, 1998 ; Gielkens *et al.*, 1999).

1.4.2 Dégradation de l'hémicellulose

Bien que les hémicelluloses soient des polysaccharides relativement complexes, leur dégradation enzymatique est bien connue et un grand nombre de bactéries et de champignons sont capables de la réaliser. Elle se fait par une action coordonnée de β -1,4 endoxylanases clivant la chaîne principale par l'intérieur, de β -1,4 exoxylanases libérant les sucres monomériques par les extrémités de la chaîne principale, de xylosidases ou xylobiases et d'enzymes auxiliaires telle que la β -glucuronidase qui clive les chaînes latérales en libérant divers mono et disaccharides (Figure I.8).

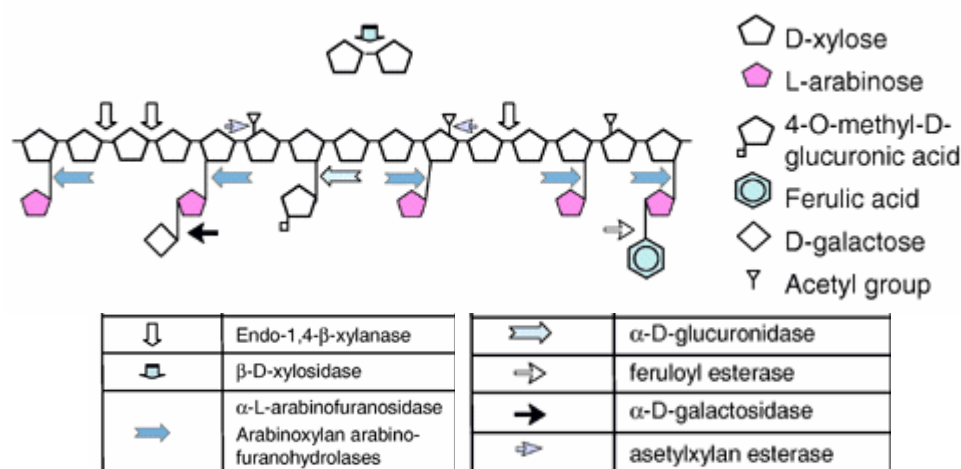


Figure I.8 : Représentation schématique de l'attaque enzymatique de l'hémicellulose d'après Aro *et al.* (2005).

Un nombre important de gènes codant pour des enzymes dégradant les hémicelluloses a été caractérisé chez l'espèce *Aspergillus* mais également chez les *Penicillium* (Kimura *et al.*, 1999). *T. reesei* possède également quatre gènes codant pour des xylanases, et dix gènes codant pour des hémicellulases ont été isolés pour cette espèce (Foreman *et al.*, 2003).

1.4.3 Dégradation de la lignine

Dans les parois des cellules végétales, la lignine forme une matrice qui entoure la cellulose et l'hémicellulose. La dégradation de la lignine est donc un préalable pour l'hydrolyse de la cellulose et des hémicelluloses. Cependant, en raison de l'hydrophobicité, de l'hétérogénéité et de la complexité structurale de la lignine, celle-ci est mal dégradée par beaucoup de micro-organismes pourtant capables de dégrader la cellulose. De plus, la lignine résiste à la plupart des agents chimiques et ne peut être extraite que par action d'oxydants forts.

Seules certaines bactéries et quelques champignons sont capables de recycler les lignines par déméthylation et coupure de liaisons à l'intérieur ou à l'extérieur du cycle aromatique. C'est le cas de certaines souches de champignons telles que *Phaerochaete chrysosporium* (Tien et Tu, 1987 ; Gold et Alic, 1993 ; Gaskell *et al.*, 1994) ou *Streptomyces viridosporus* (Schmidt et Kerner-Gang, 1986). L'attaque se fait grâce à de puissantes peroxydases exocellulaires qui permettent la lignolyse complète.

Les enzymes qui dégradent la lignine sont oxydantes et non spécifiques. Elles agissent par l'intermédiaire de médiateurs sans protéines, contrairement aux cellulases et aux hémicellulases. Les principales enzymes lignolytiques fongiques sont des manganèse-peroxydases (MnP ; EC 1.11.1.13), des lignine-peroxydases (LiP ; EC 1.11.1.14) qui catalysent une variété de réactions oxydantes dépendantes de H₂O₂, et des laccases (EC 1.10.3.1) qui oxydent les composés phénoliques, réduisant l'oxygène moléculaire en eau (Hebraud et Fevre, 1990 ; Gilbert *et al.*, 1992 ; Wilson *et al.*, 1994 ; Denman *et al.*, 1996).

1.4.4 Dégradation des pectines

Les pectines sont hydrolysées par l'action conjuguée de trois types majeurs d'enzymes : les polygalacturonate lyases qui hydrolysent les polymères d'acide galacturonique de la chaîne

carbonée principale, les pectines méthyl-estérases qui libèrent les groupements méthyles, et les polygalacturonases qui hydrolysent les polymères de galacturonates désestérifiés.

1.5 Conclusion

➤ Principaux constituants des parois végétales

- La cellulose est un polymère de glucose. L'association de molécules de cellulose constitue des fibrilles puis des microfibrilles et des macrofibrilles dont l'organisation parallèle forme des régions cristallines séparées par des régions amorphes.
- Les hémicelluloses sont des homo ou hétéropolymères constitués d'une chaîne de β -glucose avec des courtes chaînes latérales d'hexoses ou de pentoses. Elles interviennent dans l'architecture pariétale en se liant aux fibrilles de cellulose.
- La lignine est un hétéropolymère phénolique. Elle peut se lier aux hémicelluloses présentes autour des fibrilles de cellulose ce qui permet une structure aléatoire en trois dimensions protégeant les parois des enzymes exogènes.
- Autres constituants : eau, pectine, cutine, ions, protéines...etc.

➤ Organisation des parois végétales

- La paroi primaire est essentiellement constituée d'hémicelluloses, de pectines, de protéines et d'eau. Elle permet le soutien mécanique des structures, la cohésion cellulaire, le contrôle hydrique et la mise en réserve d'hydrates de carbone.
- La paroi secondaire est constituée de lignine et de microfibrilles de cellulose organisées en hélices dont le sens d'enroulement délimite trois sous-couches : externe, interne et médiane. Elle joue un rôle dans la croissance cellulaire et dans la protection face aux stress et aux attaques extérieures grâce à son contenu important en lignine.
- La lamelle moyenne est la couche la plus externe qui sépare deux cellules contiguës grâce à un dépôt de lignine, ce qui lui confère un rôle de protection.

➤ Dégradation des parois végétales

- La dégradation de la cellulose nécessite l'action combinée de cellobiohydrolases, de β -1,4 endoglucanases, de cellodextrinases et de β -1,4 glucosidases, conduisant à la libération du glucose.
- La dégradation des hémicelluloses nécessite l'action combinée de β -1,4 endoxylanases, de β -1,4 exoxylanases et d'enzymes auxiliaires.
- En raison de la complexité de la lignine très peu de bactéries et des champignons possèdent les manganèse-peroxydases, les lignine-peroxydases et les laccases nécessaires à sa dégradation.

2 PROCÉDES DE DÉGRADATION DES PAROIS VÉGÉTALES

2.1 Introduction

Des méthodes chimiques et biologiques ont été proposées et explorées pour la conversion du matériel cellulosique. Les procédés chimiques utilisés sont essentiellement l'incinération, la co-incinération et l'hydrolyse acide. L'incinération et la co-incinération sont des techniques thermiques de réduction des déchets par oxydation totale. Ces techniques se caractérisent par la réduction la plus complète et la plus rapide du volume des déchets au moyen d'une minéralisation presque totale des produits incinérés. Ces techniques permettent une valorisation du matériel cellulosique par la réutilisation des sous-produits comme remblai dans les travaux routiers et par une valorisation énergétique sous forme de chaleur distribuée par un réseau ou sous forme de production d'électricité. La dégradation par hydrolyse acide est la plus ancienne ; cependant cette technologie possède des aspects limités tant sur le plan économique que sur le plan de la toxicité de certains produits finaux.

Comparées aux méthodes chimiques, les méthodes biologiques sont plus écologiques et demandent moins d'énergie. Un procédé biologique comprend l'intervention d'une unité artisanale ou industrielle visant à contrôler et à optimiser les paramètres opératoires. Ces procédés s'opposent au « laisser-faire » qui se met naturellement en place dans les couches d'enfouissement, bien que les processus biologiques soient souvent voisins. Les procédés biologiques se divisent essentiellement en deux types de traitement : les traitements aérobies et les traitements anaérobies. Ces traitements comprennent le compostage (aérobie), la méthanisation (anaérobie) ou encore l'utilisation des enzymes microbiennes (micro-organismes aérobies ou anaérobies).

Sans que cette étude prétende à l'exhaustivité, certaines technologies biologiques performantes pour dégrader les déchets végétaux seront présentées dans la suite de ce travail.

2.2 Le compostage

2.2.1 Aspects généraux

Le compostage est défini par de nombreux auteurs (Wilson et Dalmat, 1986 ; Buchanan et Gillesman, 1991 ; Garcia *et al.*, 1992 ; Augenstein *et al.*, 1996 ; Diaz *et al.*, 2002) comme « la

décomposition et la stabilisation biologique de substrats organiques dans des conditions qui permettent le développement de températures élevées qui résultent d'une activité biologique et qui conduisent à un produit final suffisamment stable pour être utilisé sur les sols sans risques pour l'environnement ». Ce procédé mène à la production de CO₂, de vapeur d'eau, de minéraux et de matière organique stabilisée et hygiénique appelé humus (Zucconi et DeBertoldi, 1987). Seules les matières organiques comme les déchets verts, les ordures ménagères, les boues de stations d'épuration, les matières de fosses d'aisance et les déchets industriels (agroalimentaire et papier) peuvent produire de l'humus (Damien, 2003). Les matières organiques d'origine chimique comme les matières plastiques ne se décomposent pas ou mal, à l'exception des substances dont la structure est voisine des composés naturels biodégradables.

Le compostage est utilisé depuis plusieurs siècles en agriculture et en horticulture pour recycler les nutriments et augmenter la fertilité des sols (DeBertoldi *et al.*, 1983 ; Schuchardt, 2000).

2.2.1.1 Le processus

Ce processus de stabilisation de la matière organique est similaire à la décomposition de cette matière dans le sol (Sharma *et al.*, 1997). De nombreux auteurs (DeBertoldi *et al.*, 1983 ; Beffa *et al.*, 1996 ; Sharma *et al.*, 1997 ; Kutzner, 2000) identifient trois phases (Figure I.9) dans le processus de compostage : une phase mésophile, une phase thermophile, une phase de ralentissement et/ou de maturation. Ces phases peuvent se répéter au cours du compostage, notamment à la suite de retournements mécaniques pour aérer le compost.

Pendant la phase mésophile, la température monte rapidement à 40-45°C suite à la respiration des micro-organismes mésophiles aérobies (Finsten et Morris, 1975). Les populations de bactéries mésophiles et les champignons prolifèrent, dégradant dans un premier temps les composés les plus fermentescibles (Kutzner, 2000) tels les sucres et l'amidon, augmentant ainsi par leur respiration la température jusqu'à 60-70°C. Ceci conduit au remplacement des micro-organismes mésophiles par des thermophiles. En effet, quand cette température est atteinte, l'activité des mésophiles cesse et seulement les spores résistantes à la température survivent. Cette deuxième phase est caractérisée par le développement d'une population

microbienne thermophile comprenant quelques bactéries (Strom, 1985) et des actinomycètes (Amner *et al.*, 1988). Par leur respiration, ces micro-organismes vont épuiser l'oxygène de la masse en compostage ; la quantité de matière facilement utilisable par la microflore se raréfie et la biosynthèse de composés humiques devient prédominante. C'est également durant la phase thermophile que les pathogènes et les graines de mauvaises herbes sont détruits (Georgacakis *et al.*, 1996). Ensuite les micro-organismes thermophiles disparaissent au profit d'espèces plus communes et de nouvelles espèces mésophiles apparaissent au fur et à mesure que la température décroît et se stabilise au niveau de la température ambiante (Kutzner, 2000). C'est la phase de maturation ou de refroidissement. La transition entre chacune des phases citées précédemment résulte d'une évolution continue.

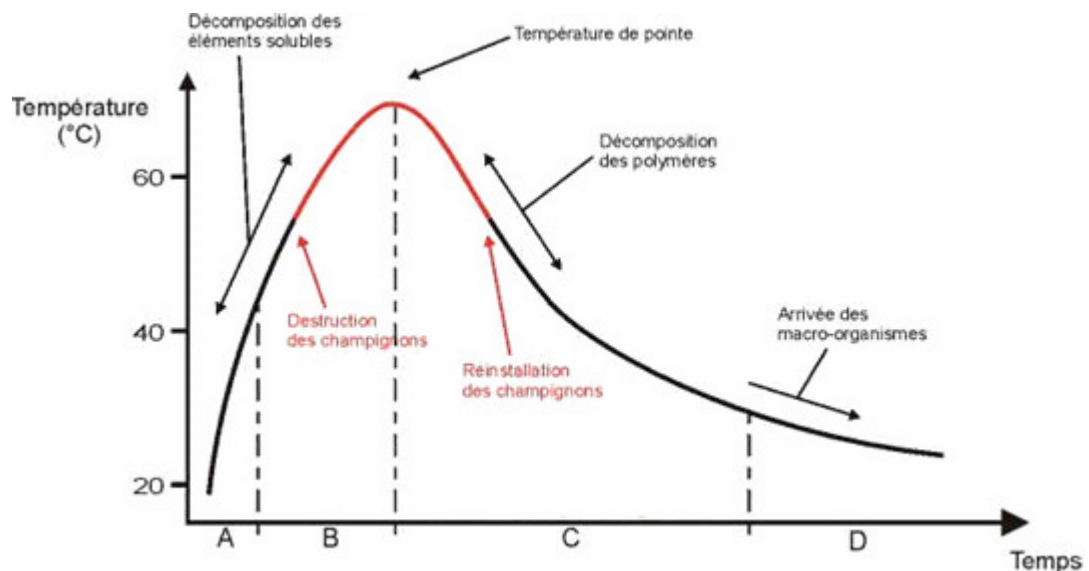


Figure I.9 : Evolution de la température durant le processus de compostage (Référence internet 3), A : Phase mésophile, B : Phase thermophile, C : Phase de refroidissement, D : Phase de maturation.

2.2.1.2 Influence de l'environnement

La progression du matériel de départ vers le stade final (l'humus) dépend d'un grand nombre de facteurs comme la dimension des particules, la nature des nutriments (rapport C/N), leur structure, le taux d'humidité, l'aération, le pH (DeBertoldi *et al.*, 1983 ; Strom, 1985 ; VanderGheynst *et al.*, 1997 ; Diaz *et al.*, 2002)...etc. De plus le maintien des conditions optimales pour les micro-organismes impliqués dans le processus de compostage est essentiel

à l'obtention d'un compost de qualité. Cependant l'aération semble être le facteur le plus important (Diaz *et al.*, 2002). Plusieurs méthodes existent :

- aération passive : seule la porosité du substrat assure l'aération de la masse (limitée à des tas de faibles dimensions),
- brassage des matériaux : la fréquence et la qualité des retournements sont les paramètres fondamentaux de cette technique,
- aération active par soufflerie : l'apport d'oxygène pendant la fermentation est ici continu ; la puissance du surpresseur est fonction du volume et du tassement de la masse à aérer,
- aération active par aspiration : l'apport d'air frais est réalisé ici par aspiration au travers des andains.

2.2.1.3 Organismes en présence

Des bactéries, des champignons et actinomycètes interviennent dans le compostage. Les bactéries restent actives durant tout le compostage en particulier à haute température et permettent l'utilisation rapide des résidus organiques. Pendant la phase mésophile, il n'y a pas d'espèces prépondérantes mais les bactéries les plus présentes sont des bactéries non sporulées telles que des coques ou bacilles Gram positif tels que *Streptococcus* sp. ou *Lactobacillus* sp. ou des bacilles Gram négatif tels que les Enterobactéries (Finstein et Morris, 1975). Pendant la phase thermophile les espèces présentes sont des *Bacillus* ou des *Thermus* (Strom, 1985).

Les champignons agissent surtout sur les matières qui résistent aux bactéries. Ils ont donc un rôle capital. Les champignons ne résistent pas à des températures supérieures à 50°C, ce qui explique qu'on les retrouve plus particulièrement en périphérie du compost. Les plus importants sont *Basidiomycetes* et *Deuteromycetes*.

Les actinomycètes agissent plus tardivement que les bactéries et les champignons et se multiplient moins rapidement. Les actinomycètes sont actifs dans les derniers stades du processus. Ils se sont spécialisés afin de s'attaquer aux structures plus résistantes comme l'hémicellulose et la lignine. Un grand nombre d'espèces sont présentes telles que

Thermoactinomyces, *Saccharomonospora*, *Thermomonospora* ou *Streptomyces* (Amner *et al.*, 1988).

2.2.2 Les différentes technologies de compostage

Les technologies de compostage s'étendent des systèmes simples d'andains à des systèmes en réacteurs plus complexes. De plus, les stratégies de compostage sont vastes, tant du point de vue de l'apport en oxygène, du contrôle de la température (Finstain *et al.*, 1986) ou du séchage (Richard, 1992). Enfin, le choix de la stratégie, de la technologie et du traitement influence les caractéristiques du produit final.

Les procédés de compostage incluent trois étapes : une étape de pré-procédé (préparation : broyage, tri...etc.), le procédé lui-même et une étape de post-procédé (traitement du produit fini). Les méthodes décrites ci-dessous ne concernent que la phase de fermentation active.

➤ Compostage individuel

La méthode de compostage en fosse est la pratique la plus anciennement employée, mais conduit rapidement à des conditions anaérobies car aucun apport ultérieur d'eau ou d'air n'est effectué. Elle est par ailleurs très lente.

➤ Compostage en andains (Windrow composting) (Figure I.10)

C'est la méthode de compostage la plus commune et la plus simple. Les déchets sont rassemblés en andains de longueur indéfinie et dont la hauteur dépend à la fois de la porosité à l'air du compost ainsi que de la fréquence et de la méthode d'aération choisie (une fréquence élevée et/ou une aération par ventilation forcée autorisent des volumes plus importants). De même les piles de compost peuvent être ou non agitées et retournées. Cette méthode est utilisée par Trois et Polster (2007) pour la dégradation d'écorces de pins.

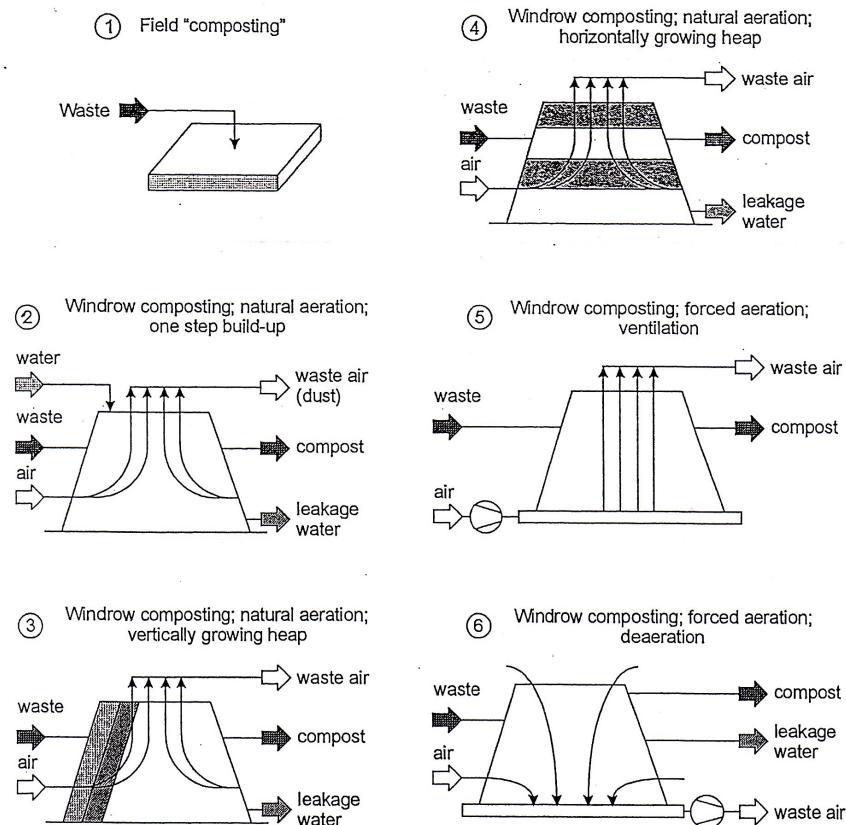


Figure I.10 : Configuration simple de compostage d'après Schuchard (2000).

Ces techniques de compostage les plus simples sont les plus utilisées et, de nos jours, un grand nombre d'agriculteurs utilisent encore ces méthodes pour traiter les excréments et fumiers d'animaux ainsi que les déchets végétaux, produisant ainsi eux-mêmes leur propre biofertilisant (Sharma *et al.*, 1997). Cependant, les systèmes en réacteur demandent moins d'espace et sont mieux contrôlés (Cekmecelioglu *et al.*, 2005). Ils permettent une étude approfondie des propriétés et caractéristiques du compost.

➤ Compostage en enceinte close ou en réacteur (Figure I.11)

Le principe commun des procédés de fermentation dite « accélérée » est basé sur le séjour plus ou moins long des déchets, dans des dispositifs appelés digesteurs. Les digesteurs sont des enceintes fermées à l'intérieur desquelles il est possible de contrôler le déroulement de la fermentation en agissant essentiellement sur l'aération. De plus, ils offrent la possibilité de collecter et de traiter les effluents gazeux et liquides, notamment pour réduire les odeurs.

○ Compostage en lit fixe (static solid bed) (Figure I.11①②)

Cette méthode est fort semblable à la précédente, mais les andains sont ici compris entre deux murets latéraux. Elle permet parfois une installation plus aisée des dispositifs d'aération mais nécessite un investissement plus important. Ce type de compostage est utilisé notamment pour le traitement des déchets organiques municipaux (Tognetti *et al.*, 2007).

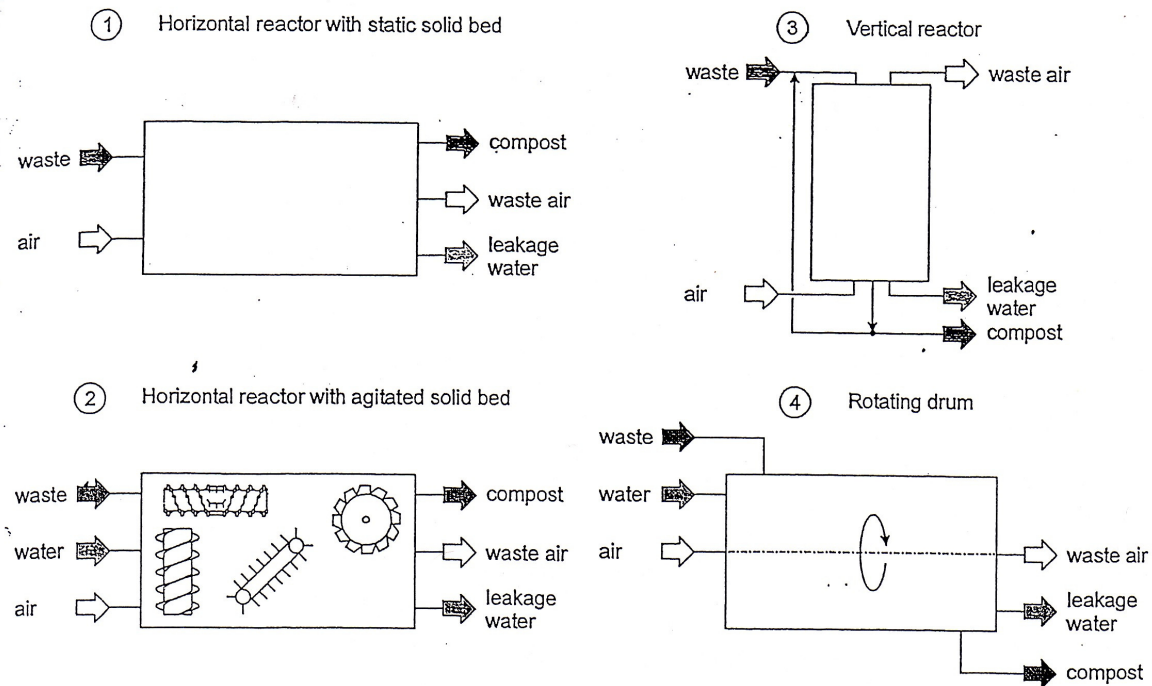


Figure I.11 : Systèmes de compostage en réacteurs d'après Schuchard (2000).

○ Réacteur à flux/circulation vertical (Figure I.11③)

De nombreux dispositifs existent, plus ou moins complexes, mais leur principe reste le même. Les déchets sont acheminés au sommet de la tour de digestion. À différents niveaux dans la masse du compost, sont installés des tuyaux d'aération permettant d'oxygéner le milieu. En fin de fermentation, le compost est récupéré à la base de la tour. Les conteneurs sont généralement cylindriques mais peuvent être rectangulaires ; ils sont agités et dynamiques.

Les réacteurs verticaux sont les plus communément utilisés pour l'étude des paramètres de compostage tels que la température, le pH, la composition du substrat...etc. (Suler et Finstein, 1977 ; Campbell *et al.*, 1990 ; 1991 ; Lau *et al.*, 1992 ; Kulcu et Yaldiz, 2004). Par exemple, Vandergheynst *et al.* (1997) ont utilisé ce type de réacteur pour tester sa reproductibilité, Schloss et Walker (2000) pour l'étude statistique de l'effet d'un inoculum défini sur la

dégradation de déchets de l'industrie alimentaire et enfin Komilis et Ham (2006) pour l'étude de la dégradation d'un mélange composé de papier, de déchets verts et de déchets alimentaires.

- Biostabilisateur ou réacteur à tambour rotatif (Figure I.11④)

Le digesteur est disposé ici, non plus verticalement, mais horizontalement. Il s'agit en fait d'un cylindre rotatif d'une longueur de 25 à 35 mètres et d'un diamètre de 3 à 4 mètres. La rotation continue du cylindre permet d'assurer à la fois le brassage et l'aération du produit ainsi que sa progression vers l'extrémité du dispositif. C'est un procédé dynamique utilisé essentiellement pour le traitement des déchets organiques municipaux par Stelmachowski *et al.*, (2003), mais également pour les traitements de déchets verts par Vuorinen et Saharinen, (1997) et Mohee et Mudhoo (2005).

Il existe des technologies complémentaires au compostage. Le vermicompostage est l'une des technologies complémentaires la plus commune (Lodgson, 1994 ; Tognetti *et al.*, 2007). Il s'agit ici d'inoculer le compost avec des vers de terre, le plus souvent de type *Eisenia foetida*. Les lombrics du compost agissent au début du processus sur des éléments peu décomposés et entraînent dans leurs terriers des fragments de feuilles ou même des feuilles entières. Les vers agissent donc sur le compost de façon physique en dégradant les substances organiques, ce qui a pour effet de les fractionner et donc d'augmenter leur surface pour l'adhésion des micro-organismes. L'action s'effectue aussi de façon chimique car les excréments produits par les vers contiennent des éléments minéraux tels que Ca, Mg, K, Na, P, utiles à la fertilisation du sol (Sharma *et al.*, 1997). Le produit fini, ou compost, obtenu par vermicompostage est donc plus fertilisant et favorable à l'environnement.

2.2.3 Efficacité des procédés de compostage

Très peu de données sur les rendements de dégradation sont présents dans la littérature, les données présentées par les différents auteurs concernent essentiellement l'évolution des paramètres microbiologiques et chimiques du compost (Vuorinen et Saharinen, 1997 ; Cekmecelioglu *et al.*, 2005 ; Komilis et Ham, 2006) et la composition finale du compost

(Sharma *et al.*, 1996 ; Stelmachowski *et al.*, 2003). Cependant quelques auteurs s'intéressent aux rendements de dégradation. Ces données sont regroupées dans le tableau I.1.

Techniques utilisées	Substrat	Temps de séjour (j)	Taux dégradation (%MS)	Auteurs
Compostage par andains	Ecorces de pins	120	9	Trois et Polster, 2007
Composteur à lit fixe	Déchets organiques municipaux	50	25-44	Tognetti <i>et al.</i> , 2007
Système batch à flux vertical	Fécès	8	56	Lopez-Zavala <i>et al.</i> , 2005
Réacteur à flux vertical	Marc de raisin	84	13-20	Diaz <i>et al.</i> , 2002
Réacteur à flux vertical	Déchets agricoles	21	42-58	Kulcu et Yaldiz, 2004
Biostabilisateur	Co-digestion déchets végétaux et fumiers de volailles	32	57	Mohee et Mudhoo, 2005
Vermicompostage	Déchets organiques municipaux	50	7-20	Tognetti <i>et al.</i> , 2007

Tableau I.1 : Comparaison des rendements de dégradation obtenus par différents auteurs en compostage.

La technologie de dégradation par compostage la plus performante semble être le réacteur à flux vertical qui permet une dégradation jusqu'à 58% de la matière sèche. Cependant nous voyons là apparaître une des premières difficultés à comparer les données bibliographiques. En effet, les auteurs caractérisent de façon différente les dégradations qui sont exprimées soit en taux de matière sèche, soit en %COD, soit en % VS (Volatile Solids), ce qui rend leur comparaison difficile.

2.3 La méthanogenèse

2.3.1 Aspects généraux

La méthanogenèse est un processus biologique où le carbone organique est converti par oxydation en CO₂ et par réduction en CH₄. Le processus de méthanogenèse est naturel et

intervient dans de nombreux environnements tels que les environnements marins, les sédiments des lacs ou dans les décharges. La matière susceptible d'être digérée est identique à celles pouvant être compostée (les déchets verts, les ordures ménagères, les boues de stations d'épuration, les matières de fosses d'aisance, les déchets industriels et les substances dont la structure est voisine de celle des composés naturels biodégradables). Les avantages de la méthanogenèse en tant que procédé de dépollution sont nombreux. Le méthane produit est utilisable comme source d'énergie. En effet, sa valorisation sur place est sûre en terme de débouchés et l'investissement est faible dans le cas d'une valorisation thermique directe par combustion. De plus, les quantités de résidus obtenus sont faibles (5 à 10 fois moindre que par voie aérobie) (Angelidaki *et al.*, 2003) et le nombre de pathogènes est réduit quand la méthanogenèse est thermophile (Dinsdale *et al.*, 2000). Enfin, la biomasse active a des besoins limités et s'adapte à des effluents très divers.

2.3.1.1 Le processus

La méthanogenèse se fait, selon les auteurs, en deux étapes (Ljung-Dahlet Eriksson, 1984) ou en quatre étapes (Damien, 2003 ; Gavala *et al.*, 2003). Les deux principales étapes sont l'étape de fermentation et l'étape méthanogène, la phase de fermentation pouvant être divisée en trois étapes : hydrolyse, acidogenèse (ou fermentation) et acétogenèse. D'une manière générale, dans l'étape de fermentation, les espèces microbiennes habituelles de la fermentation hydrolysent les polymères (Ljung-Dahlet Eriksson, 1984). Les macromolécules sont décomposées en produits plus simples ; il s'agit d'une liquéfaction avec transformation des molécules en monomères. Ces monomères sont ensuite transformés par fermentation en CO₂ et en acides organiques. Comme cette phase produit un grand nombre d'acides, elle est souvent appelée phase acidogène. Il apparaît alors de l'acétate, de l'éthanol, de l'ammoniaque, de l'hydrogène et des acides gras volatils. Ces alcools et acides gras volatils sont transformés en hydrogène, gaz carbonique et acétate durant l'étape d'acétogenèse. Les bactéries méthanogènes interviennent ensuite pour élaborer du méthane (méthanogenèse) à partir de l'acétate, du CO₂ et de l'hydrogène formés pendant l'étape de fermentation, soit par réduction du CO₂, soit par décarboxylation de l'acide acétique. Un grand nombre de bactéries peut servir de lien entre ces deux étapes (Nyns, 1986).

2.3.1.2 Les facteurs environnementaux

Comme tout micro-organisme, la population bactérienne qui constitue le consortium méthanogène exige des conditions particulières pour sa croissance. Les principaux facteurs physico-chimiques qui affectent le procédé de digestion anaérobie sont le pH, la température, le potentiel d'oxydoréduction et les besoins nutritionnels (macroéléments et oligo-éléments). La gamme de pH optimum se situe entre 6 et 8. Elle est le résultat du pH optimum de chaque population bactérienne : les bactéries acidifiantes, les acétogènes et les méthanogènes.

L'activité du consortium méthanogène est étroitement liée à la température. Deux plages de températures optimales peuvent être définies : la zone mésophile (autour de 35°C) et la zone thermophile (environ 55-60°C) avec une décroissance de l'activité de part et d'autre de ces températures. La majorité des espèces bactériennes a été isolée dans des environnements mésophiles, mais tous les groupes trophiques des étapes de digestion anaérobie possèdent des espèces thermophiles utilisant les mêmes voies métaboliques que les bactéries mésophiles. Les avantages de l'utilisation de bactéries thermophiles sont d'augmenter les vitesses de réaction ainsi que les taux et l'efficacité de l'hydrolyse, et de diminuer la présence de pathogènes. Cependant le taux final de production de méthane de la matière organique n'est pas influencé par la température dans une gamme de 30 à 60°C (Angelidaki *et al.*, 2000).

2.3.1.3 Organismes en présence

Les bactéries qui interviennent lors de la phase de fermentation sont *Acetivibrio*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bacillus* sp...etc.

Les bactéries actives de l'étape de méthanogenèse sont réunies dans un groupe qui leur est propre : les *Archae* bactéries. Les *Archae* bactéries n'utilisent qu'un nombre restreint de substrats : l'acétate, le CO₂ ou l'hydrogène. Cette spécificité permet de les identifier selon leur substrat. Ainsi, l'acétate est métabolisé par les bactéries méthanogènes acétoclastes tels que les genres *Methanosaeta* (ou *Methanothrix*) et *Methanosarcina*. Ces bactéries sont à l'origine de la plus grande partie du méthane produit dans les réacteurs biologiques de dépollution. Les bactéries méthanogènes hydrogénophiles, tels que les genres *Methanobacterium*, *Methanococcus* et *Methanobrevibacter* utilisent l'hydrogène et le dioxyde de carbone. Ces bactéries sont très répandues dans les sédiments naturels, les champs d'épandage, le rumen du bétail et les eaux usées.

2.3.2 Les technologies de méthanogenèse

Les technologies de méthanogenèse utilisent des systèmes en une étape (avec recyclage ou non de la biomasse active) ou en plusieurs étapes. Les technologies en plusieurs étapes se font généralement en deux étapes afin de séparer la fermentation et la méthanogenèse (Viturtia *et al.*, 1995 ; Raynal *et al.*, 1998 ; Dinsdale *et al.*, 2000). De plus un procédé de prétraitement est souvent associé à la méthanogenèse comme un traitement par la chaleur ou une lyse par ultrasons (Dinsdale *et al.*, 2000).

La technologie la plus simple est un système en batch mais ces réacteurs peuvent également être utilisés pour des cultures en fed-batch. Ces réacteurs sont le plus souvent utilisés pour dégrader des fumiers ou des déchets solides agricoles mais également pour la dégradation de papier (Muhlemann et Bungay, 1999) ou pour la dégradation de déchets de brasserie (Callaghan *et al.*, 1999).

D'autres technologies utilisent des réacteurs à fonctionnement continu (Muhlemann et Bungay, 1999), mélangés ou à écoulement piston, qui peuvent être horizontaux ou verticaux. Ces réacteurs peuvent être divisés en deux groupes : ceux dont la biomasse est libre (digesteurs à faible taux de dilution), et ceux dont la biomasse est immobilisée sur des particules larges (digesteurs à fort taux de dilution). La configuration à biomasse libre la plus commune est le CSTR (Continuously Stirred Tank Reactor) (Verrier *et al.*, 1987 ; Mata-Alvarez *et al.*, 1992). Cependant, ces réacteurs à biomasse libre sont continuellement mélangés ce qui a pour conséquence d'augmenter les volumes de réacteur (Skiadas *et al.*, 2003). Pour cette raison, des configurations à biomasse fixée ont été développées. Le plus fréquemment utilisé et le plus performant est le réacteur à flux ascendant (UASB ou Up-flow Anaerobic Sludge Blanket) (Figure I.12 Aa) qui permet d'atteindre des capacités d'épuration importantes (Ruiz *et al.*, 1997 ; Rajeshwari *et al.*, 2001). Ce réacteur est divisé en quatre parties (Skiadas *et al.*, 2003) : un lit granulaire, une zone fluidisée, un séparateur liquide-gaz-solide et un clarificateur. Il existe plusieurs variantes de ce réacteur tels que le EGSB (Expanded Granular Sludge Bed) (Figure I.12 Ab) dans lequel la vitesse du liquide est plus importante ou le USSB (Upflow Stage Sludge Bed) (Figure I.12 B) pour lequel le processus est compartimenté. Les réacteurs ABR (Anaerobic Baffled Reactor) (Figure I.12 C) présentent une autre technologie qui permet de diminuer le temps de rétention (Weiland et Rozzi, 1991). Ce réacteur horizontal possède plusieurs compartiments qui communiquent entre eux alternativement par le haut et par le bas. Cette technologie combinée à celle de l'UASB

permet d'obtenir un réacteur cylindrique vertical et compartimenté où le flux est alternativement ascendant et descendant. : le PABR (Periodic Anaerobic Baffled Reactor) (Figure I.12 D).

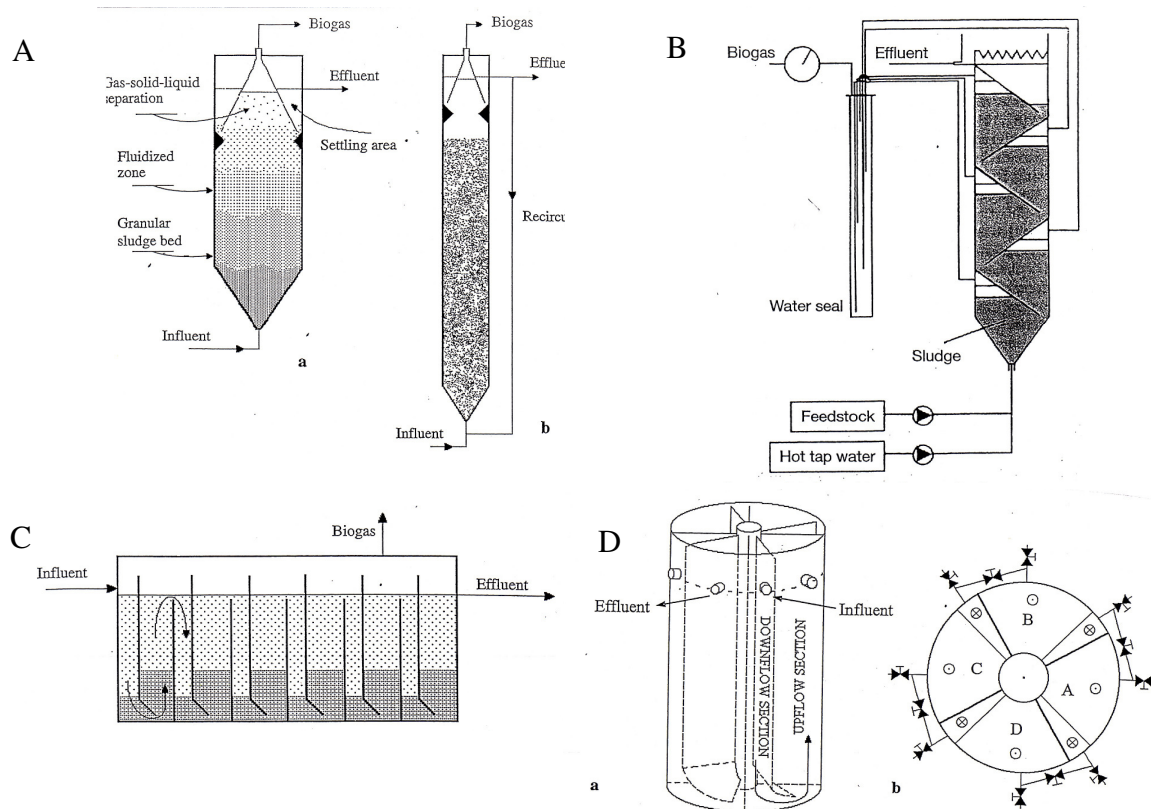


Figure I.12 : Les différents types de réacteur de méthanogénèse d'après Skiadas *et al.* (2003).

D'autres technologies sont utilisées telles que les filtres anaérobies (Ruiz *et al.*, 1997 ; Viturtia *et al.*, 1995), les digesteurs à lit fixe (Raynal *et al.*, 1998), les systèmes tubulaires (Dinsdale *et al.*, 2000) ou les systèmes tubulaires inclinés (Bouallagui *et al.*, 2003). L'avantage du système tubulaire incliné, utilisé par Bouallagui *et al.* (2003) est de séparer longitudinalement les phases acidogène et méthanogène comme un système à deux étapes. Il faut noter ici que la plupart des auteurs cités précédemment, utilise des systèmes à deux étapes. En effet, les systèmes à deux étapes paraissent plus efficaces pour la dégradation anaérobie (Bouallagui *et al.*, 2004). Par exemple Viturtia *et al.* (1995) effectuent une hydrolyse avant la méthanogénèse en vue de dégrader plus efficacement des déchets de fruits et de légumes. Raynal *et al.* (1998) séparent les deux phases de fermentation et de méthanogénèse pour la

dégradation d'épluchures de pommes de terre, de carottes, de feuilles de salade et de résidus de l'industrie du jus de pomme.

2.3.3 Efficacité des procédés de méthanogénèse

Les données concernant les techniques utilisées, le type de substrat, les temps de séjour ainsi que les rendements de dégradation présentés par différents auteurs, sont regroupées dans le tableau I.2.

Techniques utilisées	Substrat	Temps de séjour (j)	Dégradation (%)	Auteurs
Système batch	Déchets végétaux de supermarchés	47	65	Rajeshwari <i>et al.</i> , 1998*
Système batch	Déchets solides	32	58	Bouallagui <i>et al.</i> , 2001*
Système batch	Déchets bovins et/ou ovins	105	48-81	Callaghan <i>et al.</i> , 1999
Système batch	Co-digestion de déchets bovins ou ovins et de déchets de fruits et de légumes	105	34-52	Callaghan <i>et al.</i> , 1999
CSTR en une étape	Déchets organiques alimentaires	20	88	Mata-Alvarez <i>et al.</i> , 1992*
CSTR en une étape	Déchets végétaux	23	83	Verrier <i>et al.</i> , 1987*
Réacteur tubulaire	Déchets de fruits et de légumes	12-20	59-76	Bouallagui <i>et al.</i> , 2003
Deux étapes : CSTR et réacteur tubulaire incliné	Déchets de fruits et de légumes	53-159	39-44	Dinsdale <i>et al.</i> , 2000
Deux étapes : hydrolyse et UASB	Déchets végétaux de supermarchés	2,5	94	Rajeshwari <i>et al.</i> , 2001*
Deux étapes : hydrolyse et méthaniseur à membrane	Déchets de fruits et de légumes	12,9 + 5	72,4	Mtz.-Vituria <i>et al.</i> , 1994
Deux étapes : hydrolyse et méthaniseur à lit fixe	Déchets de fruits et de légumes	17-20	86-93 (%COD)	Raynal <i>et al.</i> , 1998
Deux étapes : hydrolyse et ASBR	Déchets de fruits et de légumes	3 + 10	36-45 + 68-93	Bouallagui <i>et al.</i> , 2004
Deux étapes : ASBR et méthaniseur à membrane	Déchets solides	7 + 10	88	Ruynal <i>et al.</i> , 1998*
Deux étapes : CSTR et méthaniseur à membrane	Déchets végétaux	2 + 2,3	96	Verrier <i>et al.</i> , 1987*

Tableau I.2 : Comparaison des rendements de dégradation obtenus par différents auteurs en biométhanogénèse, * cité par Bouallagui *et al.* (2005).

La technologie la plus performante semble être la technologie à deux étapes utilisant un CSTR et un méthaniseur à membrane. Cependant, comme pour les technologies de compostage, nous sommes confrontés dans la littérature, à une hétérogénéité des caractérisations de la dégradation.

2.4 Dégradation enzymatique

De nombreux micro-organismes produisent des enzymes capables de dégrader les constituants des parois végétales, notamment des champignons et des bactéries. L'utilisation de biomasse lignocellulosique, spécialement pour l'hydrolyse et la biotransformation de la cellulose et de l'hémicellulose en éthanol, est très répandue. Cette biomasse lignocellulosique est également utilisée dans l'industrie du textile, du papier ou encore en agroalimentaire.

La plupart des champignons des genres *Asco-* et *Basidiomycetes* peuvent produire les enzymes extracellulaires qui permettent de décomposer des polysaccharides tels que la cellulose (Kuhad *et al.*, 1997 ; Petre *et al.*, 1999). Un grand nombre de bactéries produit des cellulases mais les bactéries du rumen des bovidés sont les plus efficaces.

2.4.1 Utilisation des cellulases

Ces enzymes sont utilisées dans l'industrie du textile pour, notamment, délayer les tissus en jeans ou dans la composition de certains détergents. De même, dans l'industrie du papier, elles offrent au moins trois possibilités : un recyclage plus rapide du papier en augmentant la porosité de la pâte à papier et donc une élimination plus rapide de l'encre, un séchage plus rapide de la pâte lors de la fabrication de feuilles par accroissement du taux de drainage de celle-ci (Tolan et Foody, 1999), et l'élimination de résidus xylanes (Kuhad *et al.*, 1997). Enfin, dans l'industrie alimentaire, elles permettent d'augmenter la digestibilité de certains produits (en alimentation animale essentiellement), une extraction plus rapide des huiles ou du café, et une meilleure clarification des jus de pomme, de la bière...etc.

La production de cellulases a surtout attiré l'attention du fait de leur possible utilisation pour convertir un substrat renouvelable abondant dans le matériel végétal, la cellulose. En effet, la possibilité de produire notamment du biocarburant à partir de la fermentation de cellulose fait de celle-ci une source d'énergie sûre et attrayante, et également une alternative au pétrole. De

plus, la production d'un combustible propre, par l'élimination de déchets végétaux et la production d'un fertilisant en fin de processus, permet de réduire l'émission de gaz à effet de serre.

2.4.2 Technologies utilisant les cellulases

2.4.2.1 Production d'enzymes

Les technologies de culture s'étendent de la culture simple en tubes obliques sur de l'agar de dextrose de pomme de terre (Shah *et al.*, 2005), à des systèmes plus compliqués comme l'immobilisation des cellules sur des polymères (Petre *et al.*, 1999). Cependant le but commun de toutes ces technologies utilisant des champignons ou des bactéries, est de produire en quantité suffisante les enzymes responsables de la dégradation de la cellulose et de les utiliser en grande quantité dans les procédés industriels. Les micro-organismes sont donc cultivés et les enzymes extraites plus fréquemment par ultrafiltration avec des membranes dont les seuils de coupure sont plus faibles que le poids moléculaire des enzymes (25000-75000 Da).

Les exemples étant nombreux, nous avons choisi de n'en présenter qu'un seul dans le paragraphe suivant.

2.4.2.2 Exemple : production d'éthanol

La production d'éthanol se divise en deux processus importants : la saccharification et la fermentation. Mais en réalité, quatre événements biologiques interviennent dans la conversion de la biomasse cellulosique en éthanol (Lynd *et al.*, 2002) : la production de cellulases, l'hydrolyse enzymatique de la cellulose et autres polysaccharides, la fermentation des produits de l'hydrolyse de la cellulose et la fermentation des produits de l'hydrolyse de l'hémicellulose. Les biotechnologies utilisées sont caractérisées selon le degré de regroupement de ces différents événements. La figure I.13 montre les différentes configurations utilisées. La configuration SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation) se déroule en quatre étapes avec quatre biocatalyseurs. La configuration SSF (Simultaneous saccharification and fermentation) regroupe l'hydrolyse de la cellulose et la fermentation des produits de son hydrolyse. Cette configuration est la plus commune (Wirght, 1988 ; Wooley

et al., 1999). La configuration SSCF (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation) intervient en deux étapes qui sont la production de cellulase et une deuxième étape durant laquelle se déroule l'hydrolyse de la cellulose, la fermentation de produits de l'hydrolyse de la cellulose et la fermentation de produits de l'hydrolyse de l'hémicellulose. Dans la dernière configuration : CBP (Consolidated BioProcessing) toutes les étapes sont regroupées en une seule. Ce type de configuration est synonyme de la configuration DMC (Direct Microbial Conversion) (Lynd, 1996). Cette dernière approche de conversion directe du matériel cellulosique en éthanol par un seul micro-organisme permet de réduire les coûts de fabrication car on élimine la phase d'extraction des enzymes. Des champignons comme *Neurospora* ou *Fusarium oxysporum* en coculture avec *Saccharomyces cerevisiae*, des bactéries telles que *Clostridium thermocellum* en monoculture ou en coculture avec *C. thermohydrosulfuricum* sont capables de réaliser cette conversion directe.

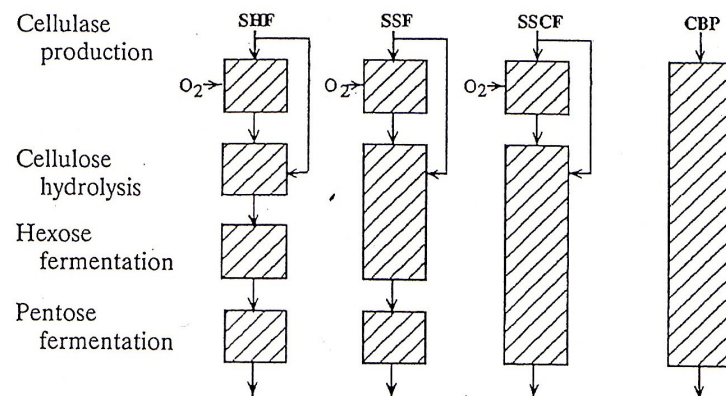


Figure I.13 : Configurations de systèmes producteurs d'éthanol à partir de déchets végétaux d'après Lynd *et al.* (2002).

2.5 Conclusion

➤ Le compostage

- C'est la décomposition accélérée de substrats organiques dans des conditions environnementales contrôlées qui conduit à un produit final suffisamment stable et hygiénisé pour être utilisé sur les sols sans risque pour l'environnement.
- Le processus de stabilisation se produit en trois phases : mésophile, thermophile et maturation faisant intervenir des champignons, des bactéries et des actinomycètes.
- Il existe diverses technologies de compostage allant du compostage individuel au compostage en réacteurs tels que des réacteurs à flux vertical ou des biostabilisateurs. Selon la technologie utilisée, les efficacités de dégradation varient de 9% (compostage en andains) à 57% (biostabilisateur).

➤ La méthanogenèse

- C'est un processus biologique où le carbone organique est converti par oxydation en CO_2 et par réduction en CH_4 .
- La méthanogenèse se fait en deux étapes : fermentation et méthanogenèse. L'étape de fermentation peut se subdiviser en trois étapes : hydrolyse, acidogenèse et acétogenèse. Cette étape s'effectue grâce aux espèces microbiennes habituelles de la fermentation. L'étape de méthanogenèse s'effectue grâce à des bactéries méthanogènes acétoclastes (utilisation de l'acétate) ou des bactéries méthanogènes hydrogénophiles (utilisation du H_2 et du CO_2).
- Il existe diverses technologies de méthanogenèse allant du système batch en une étape à des systèmes plus complexes en deux étapes à biomasse fixée. Selon la technologie utilisée, les efficacités de dégradation varient de 34% (système batch) à 96% (système à deux étapes utilisant un CSTR et un méthaniseur à membrane).

➤ Dégradation enzymatique

- Les enzymes sont utilisées dans de nombreuses industries : textile (détergents), papier (recyclage du papier), alimentaire (extraction plus rapide d'huiles ou clarification de jus de fruits) mais également dans la production de biocarburants tels que le bioéthanol pris comme exemple.
- Quatre événements biologiques interviennent dans la conversion de la cellulose en bioéthanol : la production d'enzymes, l'hydrolyse enzymatique, la fermentation des produits d'hydrolyse de la cellulose et la fermentation des produits d'hydrolyse de l'hémicellulose. Les biotechnologies utilisées varient selon le degré de regroupement de ces étapes.

3 LE RUMEN

3.1 Introduction

Les procédés artificiels de dégradation des produits végétaux qui ont été décrits précédemment sont performants en termes de vitesses et de rendements de dégradation. Mais leurs performances restent en deçà du processus de digestion naturelle installé dans le rumen des bovidés, grâce à une communauté microbienne extrêmement abondante. La flore bactérienne assure à l'écosystème rumen une stabilité et une grande efficacité dans la dégradation des composés lignocellulosiques. Les micro-organismes présents dans l'appareil digestif des bovidés hydrolysent les polysides des parois végétales en sucres assimilables par l'animal. L'efficacité de l'écosystème rumen est confirmée par des études de Gijzen *et al.* (1990) qui montrent que les micro-organismes du rumen ont une efficacité supérieure aux autres micro-organismes pour la dégradation de matériel cellulosique. Ceci est expliqué par l'existence chez ces micro-organismes d'un grand nombre d'enzymes et par des activités lignocellulosiques élevées.

Le paragraphe suivant présente donc l'écosystème rumen et sa population ainsi que les technologies dérivées de celui-ci.

3.2 Aspects généraux

L'appareil digestif des bovidés est composé de quatre compartiments (Figure I.14) :

- le réseau est un organe contractile qui assure la motricité de l'appareil digestif ,
- le rumen possède des caractéristiques physico-chimiques relativement stables : une température de 40°C, un pH compris entre 5,5 et 7, une teneur en eau d'environ 90% et un potentiel d'oxydoréduction proche de -330mV,
- le feuillet a pour rôle d'absorber une partie de l'eau et des minéraux des aliments ingérés ainsi que les produits de fermentation (AGV) issus du métabolisme de la population microbienne du rumen,
- la caillette est le véritable estomac.

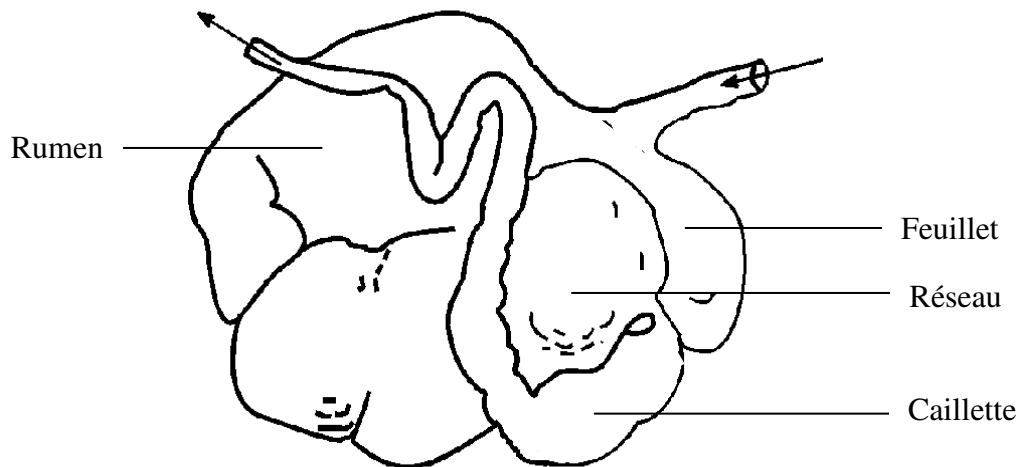


Figure I.14 : Appareil digestif des polygastriques (Référence internet 4).

C'est dans le réseau (ou réticulum) que les aliments tombent en premier. Véritable carrefour alimentaire, il peut les envoyer dans la cavité buccale pour être mâchés à nouveau, c'est la rumination, ou dans le rumen pour être fermentés. Le second segment prend le nom de rumen (ou panse). C'est le plus gros compartiment de cet estomac. Bactéries et protozoaires se multiplient dans sa lumière et réalisent la fermentation de la cellulose en dégageant du méthane et du CO_2 , qui s'échappent du rumen chaque fois que la vache éructe. Le troisième segment est le feuillet (ou omasum). Formé d'un ensemble de feuillets serrés les uns contre les autres, son rôle principal est de réabsorber l'eau des aliments et de diminuer ainsi le volume de la masse alimentaire. Ces aliments fragmentés et réduits sont enfin acheminés à la caillette (ou abomasum). C'est le vestige de l'estomac des carnivores. En effet, la caillette possède une partie des fonctions de digestion chimique de l'estomac des carnivores. Le système digestif se prolonge ensuite par l'intestin grêle et le gros intestin.

3.3 Communauté de micro-organismes dans le rumen

Plusieurs centaines d'espèces de micro-organismes sont présentes dans le système digestif du ruminant. L'assortiment microbien dans le rumen est complexe et il est hautement tributaire du régime alimentaire et du temps de séjour. Les principaux agents qui décomposent les

fibres, les sucres, les amidons et les protéines dans la panse sont tous anaérobies et comprennent : des bactéries, des protozoaires et des champignons. Ces organismes interagissent les uns avec les autres et conditionnent le métabolisme global du rumen, ce qui affecte directement l'animal ruminant.

3.3.1 Les bactéries

Les bactéries sont les principaux organismes qui déclenchent la fermentation des glucides contenus dans la membrane des cellules végétales. Il s'agit de la population la plus importante (environ 10^{10} cellules.mL⁻¹) avec plus de 200 espèces recensées (Steward et Bryant, 1988). Ces bactéries sont de plusieurs types : cellulolytiques, amylolytiques, pectinolytiques, protéolytiques et lypolytiques. Les souches cellulolytiques sont très spécialisées, à la différence des autres qui peuvent avoir plusieurs fonctions ; les souches amylolytiques peuvent également présenter une activité protéolytique. Dans le cas d'un régime riche en fibres, les trois espèces dont l'activité est la plus importante sont *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus* (Dehority, 1993).

Les bactéries conduisent à la production d'acétate, de propionate et de butyrate qui sont absorbés à travers la paroi ruminale, de succinate, d'éthanol, de lactate et de formiate, et à la production de H₂ et de CO₂ qui sont utilisés par les méthanogènes afin de produire du méthane. De nombreuses et complexes interactions existent entre les différentes espèces qui agissent en synergie (Lynd *et al.*, 2002). Elles permettent de maximiser la dégradation des végétaux.

Ces bactéries occupent quatre biotopes. Elles peuvent être libres dans le liquide mais leur activité est très faible, adhérentes à la paroi ruminale, attachées aux particules alimentaires et représenter jusqu'à 75% de la biomasse bactérienne, ou encore fixées à la surface des protozoaires.

3.3.2 Les protozoaires

Deux types de protozoaires sont présents, les ciliés (20 à 150 µm) et les flagellés (4 à 15 µm), ces derniers étant en très faible concentration. La concentration des protozoaires est d'environ 10^5 cellules.mL⁻¹, mais du fait de leur taille importante (2500 fois plus gros que les bactéries), ils représentent 50% de la biomasse microbienne.

Certains protozoaires possèdent une activité cellulolytique importante et sont capables de dégrader la cellulose par fermentation en produisant de l'acide acétique. Leur rôle dans la dégradation des parois végétales semble néanmoins limité. L'influence des protozoaires sur l'activité cellulolytique des bactéries dépend de la nature des aliments ingérés. Par ailleurs, ils se nourrissent également de bactéries par prédation. En effet, les ciliés consomment jusqu'à 10^5 bactéries par heure et possèdent également des chitinases dirigées contre les champignons (Lynd *et al.*, 2002).

3.3.3 Les champignons

Cette population, comprenant 13 espèces, est de l'ordre de 10^4 cellules.mL⁻¹ (soit 8% de la biomasse), mais un dénombrement précis reste difficile du fait de leur association très étroite avec les substrats (Joblin et Williams, 1991). Tous les champignons du rumen sont anaérobies stricts. Ils sont capables de fermenter les hydrates de carbones et contribuent donc au processus global de fermentation dans le rumen. Ils réalisent une fermentation de type acide mixte dont les produits terminaux sont le formiate, l'acétate, le lactate, l'éthanol, le dioxyde de carbone et le dihydrogène. Par ailleurs, ils contribuent activement à la dégradation du matériel végétal car ils ont un rôle important dans la destruction des parois lignifiées, ce que la plupart des bactéries ruminales est incapable de faire.

3.4 Dégradation des parois végétales dans le rumen

La symbiose entre l'animal et les micro-organismes permet un système coopératif dans lequel les deux tirent un bénéfice (Hungate, 1984). Le ruminant offre un environnement favorable aux micro-organismes. Les produits finaux des micro-organismes sont utiles au ruminant pour son métabolisme. Les acides gras lui servent de source d'énergie et les cellules constituent une grande source de protéines et d'acides aminés.

La paroi des cellules végétales est dégradée dans le rumen par une interaction entre les bactéries, les champignons et les protozoaires. Cependant les bactéries et les champignons

interviennent à 80% dans le processus de dégradation contre 20% attribués aux protozoaires (Dijkstra et Tamminga, 1995).

Le taux rapide d'hydrolyse de la cellulose dans le rumen est essentiellement dû à trois stratégies utilisées par les micro-organismes. La première est basée sur la synthèse d'une quantité importante d'enzymes non spécifiques (Weimer, 1996). La seconde stratégie, utilisant les champignons du rumen, est de produire une quantité importante d'enzymes possédant une activité très spécifique (Wood *et al.*, 1986). Les bactéries cellulolytiques du rumen utilisent une troisième stratégie qui est de concentrer leur production d'enzymes à la surface de la cellulose, probablement en formant des complexes multienzymatiques : les cellulosomes (Miron *et al.*, 1989 ; Stewart et Flint, 1989).

3.4.1 Micro-organismes fibrolytiques et enzymes

La diversité des enzymes présentes dans le rumen provient non seulement de la diversité de la communauté de micro-organismes mais également de la multiplicité des enzymes produites par chaque micro-organisme (Doerner et White, 1990 ; Malburg et Forsberg, 1993 ; Flint *et al.*, 1994). Les principaux micro-organismes fibrolytiques du rumen sont : *Fibrobacter succinogenes* (Gram négatif), *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* (Gram positif). *Prevotella* n'est pas considérée comme une bactérie avec une activité cellulolytique importante mais produit une gamme de xylanases utiles à la dégradation. De plus, certains champignons sont considérés comme importants dans la dégradation des fibres. Il est également évident que les protozoaires jouent un rôle dans la dégradation des fibres mais celui-ci est encore mal connu (Devillard *et al.*, 2003).

La plupart des enzymes produites dans le rumen, intervenant sur la cellulose et l'hémicellulose, sont des glycosyl-hydrolases (GH) qui clivent les ponts glycosidiques entre les carbohydrates (Henrissat et Bairoch, 1993). L'efficacité de dégradation dans le rumen dépend donc d'un grand nombre de GH incluant des endoglucanases (EC 3.2.1.4), des exoglucanases (EC 3.2.1.9) et des β -glucosidases (EC 3.2.1.21) qui travaillent en synergie pour hydrolyser la cellulose.

Un grand nombre de GH a été isolé de *Ruminococcus albus* (Ohmiya *et al.*, 1982, 1985, 1990 ; Poole *et al.*, 1990 ; Miyagi *et al.*, 1998). De même *Ruminococcus flavefaciens* possède un grand nombre de GH (Howard et White, 1988 ; Doerner et White, 1990 ; Vercoe *et al.*, 1995a et 1995b). Les enzymes isolées de *Fibrobacter succinogenes* sont détaillées dans le paragraphe 4.4. Enfin *Prevotella* est capable d'utiliser une grande variété de polysaccharides

et contribue à la dégradation des xylanes dans le rumen. Un grand nombre de GH a été identifié chez *Prevotella* (Vercoe et Gregg, 1992 ; Wulff-Strobel et Wilson, 1995).

Bien que chaque micro-organisme produise des enzymes avec des activités différentes qui permettent individuellement d'hydrolyser certains composants des cellules végétales, la dégradation complète requière une large gamme d'enzymes fibrolytiques capables d'agir simultanément et en synergie. Dehority (1973) propose deux types de synergies pour la dégradation de la cellulose : la première synergie consiste en une dégradation séquentielle, c'est-à-dire qu'une espèce dégrade un composant des cellules végétales permettant ainsi l'accès à d'autres composants pour d'autres espèces, la deuxième est une synergie sur les produits terminaux de certaines espèces qui stimulerait la production d'enzymes par d'autres espèces.

3.4.2 Les champignons du rumen

Le rôle actuel des champignons dans le rumen n'est pas encore complètement résolu mais on sait qu'ils colonisent le tissu végétal et semblent dégrader le tissu lignifié non dégradé par les autres micro-organismes (Lowe *et al.*, 1987). Ils sont capables de dégrader 34% de la lignine des tissus végétaux (McSweeney *et al.*, 1994). Cette dégradation s'effectue grâce à deux mécanismes : physique et chimique. La dégradation physique se fait par projection d'hyphes dans la structure végétale au niveau d'orifices existants (stomates, surfaces endommagées), ce qui conduit à l'éclatement du matériel végétal par accroissement du diamètre de ces hyphes (McSweeney *et al.*, 1994). La dégradation chimique se fait grâce aux enzymes cellulolytiques des champignons qui sont parmi les plus performantes et peuvent même avoir, *in vitro*, une activité supérieure à celle des bactéries (Roger *et al.*, 1990). Ces deux actions physique et chimique des champignons vis-à-vis du matériel végétal facilitent la pénétration des enzymes fibrolytiques des bactéries dans la structure des végétaux et l'adhésion des bactéries cellulolytiques aux végétaux.

L'importance des champignons réside dans leur synergie avec les bactéries du rumen (Dehority et Tirabasso, 2000). *Neocallimastix sp.* est celui qui est le plus étudié. Il est très actif contre la cellulose cristalline et possède un grand nombre d'enzymes : des endoglucanases, des glucosidases, des cellobiases, des lichenases, des acétyl esterases, des

cellobiosidases, des β -glucosidases, des glucanases et des cellobiohydrolases (Hebraud et Fevre, 1990 ; Gilbert *et al.*, 1992 ; Wilson *et al.*, 1994 ; Denman *et al.*, 1996).

3.4.3 Efficacité de dégradation

Le processus d'adhésion est absolument nécessaire pour l'efficacité de dégradation des fourrages et de graines de céréales dans le rumen (McAllister *et al.*, 1994 ; McAllister et Cheng, 1996). Les micro-organismes qui interagissent avec le substrat sont divisés en trois sous-populations : ceux associés au jus de rumen, ceux attachés faiblement aux substrats et ceux fortement attachés aux substrats. L'association intime avec la paroi végétale engendre une structure moléculaire sophistiquée : le cellulosome, découvert dans un premier temps pour des cultures d'un organisme non ruminal, *Clostridium thermocellum* (Miron *et al.*, 1989). Le cellulosome est un complexe d'adhésion à la surface de la cellulose ; il est composé de 18 à 20 protéines arrangées dans une orientation supramoléculaire qui facilite l'adhésion à la cellulose et sa dégradation (Felix et Ljungdahl, 1993). Cette stratégie d'adhérence à la cellulose possède plusieurs avantages : les enzymes cellulolytiques sont concentrées sur le substrat, ce qui permet une première attaque du substrat et un accès plus facile au substrat pour d'autres micro-organismes. Le cellulosome est donc une structure extracellulaire qui apparaît dans la plupart des cas comme essentielle à la dégradation de la cellulose cristalline (Schwarz, 2001). Le cellulosome fournit également à chaque micro-organisme avec une compétition directe, un avantage dans l'utilisation des produits solubles issus de l'hydrolyse (Schwarz, 2001). Il apparaît que certains champignons possèdent un mécanisme semblable au cellulosome et qui joue un rôle identique dans l'adhésion à la cellulose (Freelove *et al.*, 2001). Cette adhésion peut être affectée par l'âge de la bactérie, la compétition entre bactéries, la nature du substrat, sa surface, son hydratation, sa charge ionique et par des facteurs environnementaux tels que le pH et la température (Miron *et al.*, 2001).

3.5 Technologies utilisant les micro-organismes du rumen

Le rumen peut être assimilé à un système de fermentation à alimentation semi-continue en solide et continue en liquide. Différents systèmes de fermentations artificiels ont été élaborés, essentiellement pour se substituer aux animaux et déterminer la valeur nutritionnelle des aliments. Cependant plus récemment, les micro-organismes du rumen, essentiellement les bactéries, ont été également cultivés pour produire en quantité suffisante les enzymes responsables de la dégradation de la cellulose et les utiliser dans l'industrie (textile, agroalimentaire ou du papier) (Cf. §2.3).

Depuis le premier rumen artificiel imaginé par Pearson et Smith (1943), de nombreux modèles ont été réalisés, du plus simple en tube (Huang et Forsberg, 1987) à des systèmes plus compliqués en réacteur comme le RUSITEC (Czerkawski et Breckenridge, 1977) avec un contrôle de la température et de l'agitation. Le choix de la technologie et de la stratégie de culture est influencé par le but de celle-ci. En effet, les technologies les plus simples sont généralement utilisées pour la production d'enzymes responsables de la dégradation des parois des cellules végétales alors que les technologies plus compliquées sont utilisées pour améliorer l'alimentation des ruminants en observant la flore ruminale totale sous certaines conditions. Czerkawski (1976) différencie trois types de fermenteurs.

- Système d'incubation simple type batch (type I) (Figure I.15)

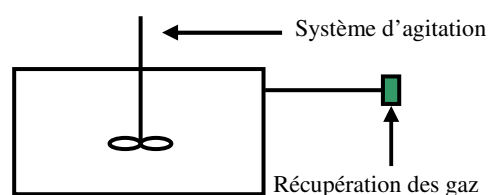


Figure I.15 : Schéma simplifié d'un fermenteur de type I d'après Guy (1988).

Le système couramment utilisé est le système dit fermé. Le dispositif consiste en une batterie de réacteurs en verre (5 réacteurs dans le dispositif décrit par Czerkawski et Breckenridge en 1969) munis chacun d'une sortie de gaz de fermentation reliée à une colonne d'eau pour leur récupération et leur mesure, ainsi qu'une sortie pour les prélèvements. L'agitation est assurée

par la recirculation des gaz de fermentation. Bien que cette méthode permette d'obtenir des indications sur l'activité fermentaire en fonction de divers paramètres (pH, température, taux de dilution), ce type de réacteur est peu représentatif du fonctionnement réel du rumen (Guy, 1988).

➤ Système à alimentation continue (type II)

Les systèmes de fermenteurs type II (Figure I.16) sont des fermenteurs artificiels à flux continu : la solution tampon est amenée au fermenteur en continu grâce à une pompe péristaltique et le milieu réactionnel est évacué hors du fermenteur, soit par un système de trop plein, soit par pompage. La récupération des gaz, le contrôle de la température et l'agitation sont par ailleurs assurés.

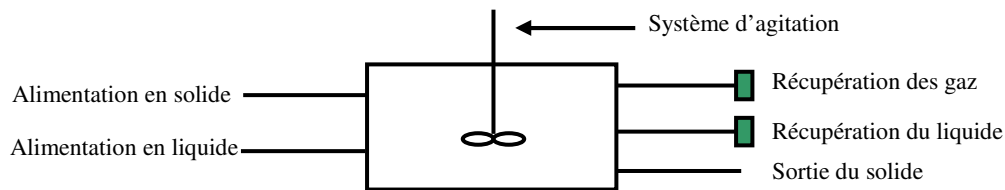


Figure I.16 : Fermenteurs de type II d'après Guy (1988).

○ Alimentation continue en liquide et en solide

Le premier appareil offrant de bonnes conditions de simulation du rumen est mis au point par Hoover *et al.* (1976). Celui-ci possède une double sortie qui permet de réguler indépendamment l'un de l'autre le taux de dilution des phases solides et liquides. Ces travaux sont repris par Gijzen *et al.* (1986). Le rumen artificiel de Gijzen *et al.* (1986) permet une addition automatisée de substrats solides.

○ Alimentation continue en liquide et semi continue en solide

Dans le type à alimentation continue en liquide et semi continue en solide, le liquide (salive) est infusé au moyen d'une pompe péristaltique et le substrat est ajouté périodiquement dans le réacteur. L'aliment est, soit introduit en vrac, ou bien contenu dans un sac de nylon. L'avantage de la deuxième solution est de pouvoir mesurer la dégradation de l'aliment en analysant le contenu du sachet en fin de fermentation. Elle permet également d'étudier la population microbienne attachée aux résidus dans les sachets. Czerkawski et Breckenridge

(1977) ont apporté des améliorations aux systèmes existants permettant ainsi une innovation nommée RUSITEC. Ce type de réacteur permet le maintien d'une population de micro-organismes du rumen dans des conditions contrôlées pour de longues périodes, la détermination des caractéristiques de fermentation selon l'alimentation de l'animal donneur, et la simulation de la dégradation des végétaux.

Ce système de fermentation qui sera utilisé dans ce travail est décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes ».

➤ Système à alimentation continue en liquide et à membrane semi-perméable (type III)

Une membrane semi-perméable (Gray *et al.*, 1962 ; Rufener *et al.*, 1963) (Figure I.17) est ajoutée par rapport aux fermenteurs de type II, afin de simuler les échanges intervenants au niveau de la paroi du rumen. L'alimentation en substrat solide peut être de type continue ou discontinue.

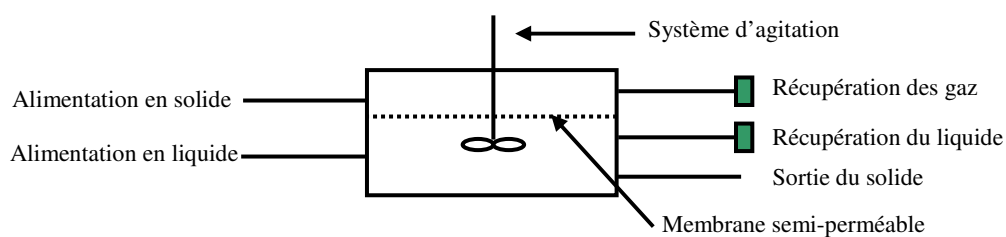


Figure I.17 : Fermenteurs de type III d'après Guy (1988).

3.6 Conclusion

Le rumen est l'un des quatre compartiments prégastriques des ruminants avec le réseau, le feuillet et la caillette. C'est dans cet organe que sont dégradés puis fermentés les polysides des parois végétales par une communauté microbienne dense et diversifiée et ceci grâce aux conditions adéquates de pH, de potentiel d'oxydo-réduction, de température et d'anaérobiose qu'offre le rumen.

➤ Communauté ruminale

- Les bactéries représentent la population la plus importante en nombre. Elles sont de plusieurs types : cellulolytiques, amylolytiques, pectinolytiques, protéolytiques et lipolytiques. Lors d'un régime riche en fibre *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus* sont les espèces les plus actives.
- Les protozoaires représentent 50% de la biomasse microbienne du fait de leur taille importante. Certains possèdent une activité cellulolytique mais leur rôle dans la dégradation des parois végétales est limité.
- Les champignons contribuent activement à la dégradation du matériel végétal du fait de leur capacité à dégrader la lignine.

➤ Dégradation des parois végétales

- Dans le rumen, les micro-organismes fibrolytiques produisent un grand nombre d'enzymes permettant la dégradation de la cellulose et des hémicelluloses. Ces enzymes agissent de façon individuelle et en synergie. Les champignons du rumen sont importants dans cette dégradation du fait de leur capacité à dégrader la lignine. Enfin, l'efficacité de dégradation dans le rumen nécessite l'adhésion des micro-organismes aux végétaux par une structure moléculaire sophistiquée : le cellulosome.
- Il existe diverses technologies utilisant les micro-organismes du rumen allant de la culture en tube à des technologies plus complexes en réacteur tel que le RUSITEC. Les technologies les plus simples sont utilisées pour produire les enzymes fibrolytiques et les technologies les plus complexes pour améliorer l'alimentation des ruminants.

4 FIBROBACTER SUCCINOGENES

4.1 Introduction

Les principales espèces bactériennes cellulolytiques du rumen sont : *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*.

Fibrobacter succinogenes est la bactérie cellulolytique du rumen la plus active pour la digestion de la cellulose cristalline et la plus performante en terme de dégradation dans le cas d'un régime riche en substrat difficile à dégrader tel que la paille, car elle devient dominante quand le substrat est fortement lignifié. Elle représente alors 20% de la population. Cette efficacité de dégradation de la cellulose est due à un système cellulolytique important et efficace. Elle dégrade également très efficacement les hémicelluloses et particulièrement le xylane (Forsberg *et al.* 1984), et à l'exception de la lignine, elle est capable de dégrader tous les polymères pariétaux des cellules végétales car elle possède des estérases qui dépolymérisent la lignine (non digestible) enchâssée dans l'hémicellulose (digestible).

En raison de ces capacités importantes dans l'écosystème rumen, cette bactérie est utilisée dans le cadre de notre étude.

4.2 Aspects généraux

Bryant et Doest (1954) ont isolé *Fibrobacter succinogenes* S85 à partir du rumen de bovin. Des études ultérieures ont permis d'isoler des souches du genre *Fibrobacter* à partir d'appareils digestifs de monogastriques tels que le cheval ou le rat (Stewart et Flint, 1989). Elle est tout d'abord classée comme *Bacteroides*, puis en 1988 suite au séquençage de son ARN 16S par Montgomery *et al.* (1988), elle est classée sous la dénomination de *Fibrobacter*. C'est un bacille pléomorphe (0,3-1,6 x 0,8-1,6 µm) (Figure I.18), Gram négatif, non pigmenté, anaérobie strict. *F.s.* possède la caractéristique d'avoir un taux de lyse important au cours de la croissance (Wells et Russel, 1996a), alors que la lyse bactérienne est généralement associée aux cellules en fin de croissance. Cette lyse semble due à des autolysines qui sont inhibées en phase stationnaire. Ce phénomène n'est donc pas une réponse à une privation et semble être régulé par un mécanisme entraînant la dégradation protéolytique des autolysines (Wells et Russel, 1996b).

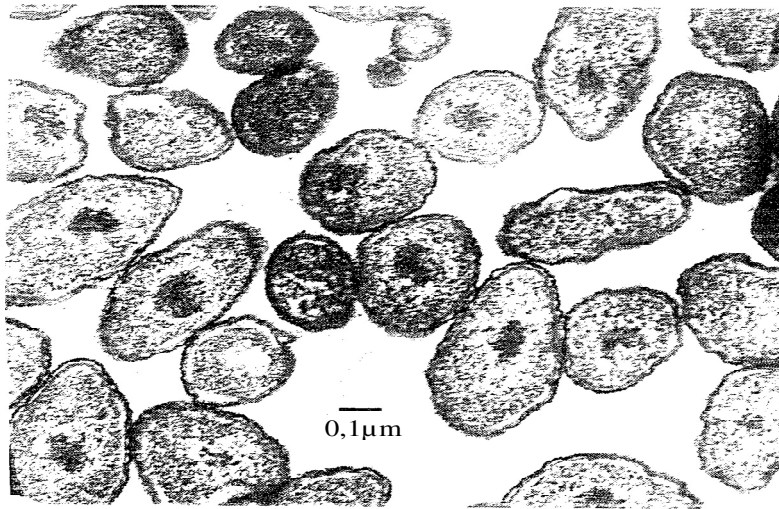


Figure I.18 : Photographie en microscopie électronique à transmission de coupes de cellules de *Fibrobacter succinogenes* S85 en culture sur glucose, cliché réalisé par C. Matheron, B. Gaillard-Martinie, INRA, Clermont Fd/Theix (1997).

4.3 Exigences de croissance

Fibrobacter succinogenes est une bactérie anaérobie stricte qui nécessite un potentiel d'oxydoréduction faible, environ -330 mV, pour sa croissance. Celle-ci est optimale pour des températures de 25 à 45°C et des pH de 5,5 à 7,7 (Bryant et Doest, 1954). La diminution du pH intracellulaire est l'argument le plus important pour expliquer la diminution de croissance et la diminution de la digestion de la cellulose (Russell, 1987).

Cette bactérie cellulolytique utilise le glucose, le cellobiose et la cellulose comme sources de carbone et a des besoins simples en azote : l'ammoniaque (NH₃) est utilisée comme seule source d'azote. Elle n'a donc pas besoin d'acides aminés et une bonne croissance est obtenue avec seulement de la cystéine et de l'ammoniaque dans le milieu (Bryant, 1959). De plus, Bryant et Robinson (1960) montrent que *F.s.* ne peut pas utiliser l'azote provenant d'autres sources et qu'une grande diversité de source d'azote n'augmente pas la croissance de façon significative.

F. s. paraît être sensible à la privation (Wells et Russel, 1996b) et a donc certaines exigences nutritionnelles de croissance. En effet, en limitation par l'ammoniaque ou par les AGV, notamment le valérate, l'isobutyrate ou le DL 2 méthylbutyrate, les cellules perdent leur capacité à digérer la cellulose (Dehority *et al.*, 1967) par diminution de l'activité

cellulolytique (Maglione *et al.*, 1997). Il en est de même si le milieu ne contient pas de biotine (groupement prosthétique des enzymes catalysant les réactions des carboxylation), d'acide para aminobenzoïque (co-enzyme impliquée dans les réactions de réarrangements), ou certains ions comme Na^+ , K^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} , du phosphate ou du carbonate (Bryant *et al.*, 1959). Les cations Ca^{2+} et Mg^{2+} sont des co-facteurs de nombreuses enzymes et une concentration en Ca^{2+} supérieure à 20 mM est indispensable à la croissance de *F.s.* S85 (Caldwell et Arcand, 1974).

4.4 Adhésion au substrat

Fibrobacter succinogenes adhère de façon très étroite à la cellulose (Miron *et al.*, 1989) et, par conséquent, peut la digérer (Chesson et Forsberg, 1997). L'adhésion est donc une étape importante dans le processus de la cellulolyse. Elle est le facteur pré-requis pour la dégradation du matériel cellulolytique. La surface du substrat, la cristallinité de celui-ci et la source de la cellulose utilisée, peuvent influencer sur le taux de digestion de la cellulose, mais Weimer *et al.* (1990) et Maglione *et al.* (1997) ont conclu que l'aire de contact, donc l'adhésion, était le facteur le plus important pour la digestion ruminale de la cellulose. Pour *F.s.*, le maximum d'attachement à la cellulose est obtenu après un quart d'heure. Dans le rumen, la concentration en sucres est faible et l'affinité pour le substrat est le facteur clé de la compétition bactérienne (Russell et Baldwin, 1979). *F.s.* a une affinité pour le glucose plus faible que les autres bactéries du rumen telle que *Butyrivibrio fibrisolvens*. Cependant, du fait de son attachement très fort à la cellulose (Halliwell et Bryant, 1963), une haute affinité pour le glucose n'est pas nécessaire.

Le mécanisme d'adhésion de *F.s.* est encore mal connu mais trois hypothèses peuvent être avancées : la première implique une liaison par l'intermédiaire des enzymes de surface, la seconde nécessite l'intervention d'adhésine (protéine de surface des cellules), la dernière repose sur des interactions ioniques non spécifiques. Il est possible que certains de ces mécanismes interviennent en même temps et fonctionnent en synergie. Il semble que ce mécanisme soit influencé par la concentration, et surtout par la nature du substrat disponible. Il n'y a pas d'adhésion sur l'amidon par exemple (Roger *et al.*, 1990). Ce mécanisme

d'adhésion est K^+ (Forsberg *et al.*, 1994) et Na^+ dépendant et il est inhibé par des inhibiteurs d'ATPases membranaires (Roger *et al.*, 1990). Ceci suggère que seules les cellules métaboliquement actives sont capables d'adhérer. De plus des études montrent que les bactéries produisent beaucoup d'enzymes cellulolytiques et quelques protéines qui adhèrent à la cellulose (CBPs : Cellulose Binding Proteins) (Miron *et al.*, 1989 ; Chesson et Forsberg, 1997) ; cependant beaucoup de CBPs possèdent aussi une activité cellulolytique en plus de leur capacité à adhérer, et sont souvent classées dans les enzymes cellulolytiques (Chesson et Forsberg, 1997).

Des études en microscopie électronique suggèrent l'existence d'un cellulosome qui intervient dans le mécanisme d'adhésion (Miron *et al.*, 1989 ; Gong et Forsberg, 1989). De même des études physiologiques de Minato et Suto (1978) montrent qu'il existe des facteurs physiologiques qui affectent l'adhésion à la cellulose (la température et la force ionique du tampon). Enfin, des études morphologiques de Groleau et Forsberg (1981) et de Gaudet et Gaillard (1987) confirment l'attachement de la cellule à la fibre de cellulose (Figure I.19).

Gong et Forsberg (1989) ont montré qu'un traitement à la formaline des cellules diminue leur capacité d'adhérence à la cellulose. De plus, l'adhésion n'est pas modifiée par les saccharides, le glucose, le mannose, le maltose et le xylose, mais elle est inhibée par le cellobiose, la CMC (Carboxy Methyl Cellulose) et la méthylcellulose. Roger *et al.* (1990) ont également montré que les cultures de *F.s.* traitées avec des ionophores et du lasalocide perdent leur capacité à s'attacher à la cellulose.

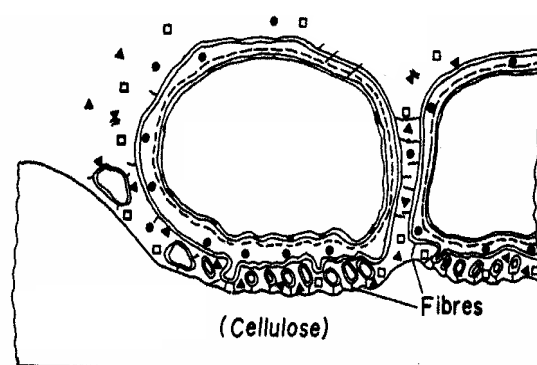


Figure I.19 : Coupe transversale de *F. s.* adhérant à la cellulose d'après Orpin et Joblin (1994).

Enfin, quand *F.s.* est cultivé sur cellulose, les cellulases restent associées aux cellules et la surface de la cellulose est complètement saturée en cellules (Halliwell et Bryant, 1963). La digestion de la cellulose dépend de l'aire des particules accessible à la fixation et à l'activité des cellulases (Field *et al.*, 2000).

4.5 Métabolisme des sucres simples

4.5.1 Aspects généraux

Le glucose et le cellobiose sont fermentés par *Fibrobacter succinogenes* pour produire du succinate, de l'acétate, du formiate et du CO₂ (Bryant et Burkey, 1953 ; Scheifinger et Wolin, 1973 ; Steward et Flint, 1989 ; Weimer, 1993). Ainsi, les produits obtenus sont les mêmes, quelque soit le substrat utilisé (Matheron *et al.*, 1996).

4.5.2 Transport des sucres

Le transport est la première étape du métabolisme des sucres et celui-ci correspond souvent à une caractéristique clé de la survie des bactéries dans leur environnement. *F.s.* dégrade la cellulose en cellohextrine, cellobiose et glucose qui se retrouvent majoritairement dans le périplasme. La bactérie est capable d'utiliser simultanément le glucose et le cellobiose (Gaudet et Cheng, 1990). Ils sont transportés à l'intérieur de la cellule par deux mécanismes de transport actif distincts (Franklund et Glass, 1987) dont la synthèse est constitutive.

Malgré son aptitude à dégrader les xylanes et malgré la présence d'une enzyme de la voie des pentoses phosphates, *F.s.* n'utilise pas le xylose car elle est dépourvue de transporteur et de système de phosphorylation de ce sucre (Matte *et al.*, 1992).

La PEP-PTS (PhosphoEnol-Pyruvate PhosphoTransférase System) du transport de glucose est limitée aux bactéries qui métabolisent le glucose par la voie EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) (Romano *et al.*, 1970). Martin et Russell (1986) montrent que toutes les bactéries du rumen possèdent une activité PEP-PTS. Cependant chez *F.s.* le taux d'activité semble très faible ; ce mécanisme ne serait donc que secondaire chez *F.s.* pour le transport du glucose. Franklund et Glass (1987) ont montré que ce transport est Na⁺ et Li⁺ dépendant mais pas K⁺ dépendant. De

plus Chow et Russell (1992) ont montré que ce transport semble être un transport symport Na^+ dépendant. Ces mêmes auteurs indiquent que le Na^+ est absolument nécessaire pour le transport de glucose, qu'une différence de gradient électrique transmembranaire ($\Delta\Psi$) ou une différence de gradient Na^+ (Δ_{PNa}) peuvent diriger le transport, ce qui n'est pas le cas pour une différence de gradient de pH (ΔpH), même en présence de Na^+ . Ceci montre que le transport de glucose se fait en symport Na^+ -dépendant. De plus, beaucoup de transports Na^+ -dépendants peuvent fonctionner avec le Li^+ (Maloy *et al.*, 1990) ; ceci a été vérifié pour *F.s.*. Des études portant sur l'effet du pH sur la croissance montrent que *F.s.* est incapable de survivre à de faibles valeurs de pH (<5,5) ; ceci semble être dû au mécanisme de transport symport Na^+ qui est sensible au pH (Chow et Russell, 1992 ; Martin, 1994).

Franklund et Glass (1987) montrent que le transport de glucose est inhibé par les composés qui inhibent le transport d'électrons, par la synthèse d'ATP et par le cellobiose et le 2 deoxy-D-glucose. La monensine est un antibiotique ionophore qui altère la fermentation. En effet sur des cellules de *F.s.*, la monensine inhibe le transport du glucose (Chow et Russell, 1992). Il en est de même pour la lasalocide, le cellobiose et le 2-deoxy-D-glucose (Franklund et Glass, 1987).

Le cellobiose et le glucose sont utilisés de façon différentielle (Matheron *et al.*, 1996), c'est-à-dire que lorsque *F.s.* est cultivé sur ces deux sucres (cellobiose et glucose), ils sont incorporés et transportés simultanément (Maas et Glass, 1991). Franklund et Glass (1987) ont montré que ces deux sucres étaient transportés dans la cellule par deux mécanismes de transports actifs distincts dont la synthèse est constitutive. Les composés qui interfèrent avec le transport d'électrons et la maintenance du gradient Na^+ membranaire inhibent le transport du cellobiose. Ceci indique que ce transport est un transport actif par une perméase Na^+ dépendante.

4.5.3 La voie Embden-Meyerhof-Parnas (Figure I.20)

Dans le cytoplasme, le glucose est phosphorylé par une glucokinase GTP dépendante (Franklund et Glass, 1987) et le cellobiose est clivé en glucose et en glucose 1 phosphate par l'action d'une phosphorylase (Well *et al.*, 1995). Les sucres résultants sont métabolisés par la glycolyse (Miller, 1978 ; Gaudet *et al.*, 1992). *F.s.* possède une fructose 1,6-bisphosphate

aldolase et une glyceraldehyde 3-phosphate ; elle fermente donc les hexoses par la voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Joyner et Bladwin, 1966 ; Miller, 1978). Mais Matheron *et al.* (1997) montrent que les cellules de *F.s.* peuvent également métaboliser le glucose par la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates. De plus cette voie alternative fournit des pentoses phosphorylés pour la synthèse d'acides nucléiques de façon plus directe que la voie EMP.

La voie EMP fournit 90% de l'énergie produite au cours des fermentations (Wallnofer *et al.*, 1966) et représente la principale source d'ATP pour les micro-organismes du rumen. Cette voie permet la conversion d'une mole de glucose en deux moles d'ATP, deux moles de pyruvate et deux moles de NADH. La première étape consiste en la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate (G6P). Cette conversion peut s'effectuer directement lors du transport du glucose par le système PEP-PTS dans lequel le donneur d'électron est le phosphoénol-pyruvate. La phosphorylation peut également être réalisée par une glucokinase fonctionnant avec un nucléoside triphosphate. Ces enzymes sont non spécifiques et catalysent la phosphorylation de nombreux substrats tels que le fructose ou le mannose. Chez *Fibrobacter succinogenes*, une glucokinase GTP dépendante a été mise en évidence. Cette glucokinase est activée par les cations K^+ et Mg^{2+} .

Le G6P est ensuite converti en D-fructose-1,6-diphosphate (F1,6PP) par une glucose phosphate isomérase et une phosphofructokinase. Celle-ci est très spécifique et nécessite la présence d'ATP et de Mg^{2+} . Chez *F.s.*, une forte activité d'une PPi-phosphofructokinase (Pyrophosphate inorganique) et une faible activité ATP- phosphofructokinase ont été démontrées par Robertson et Glucina (1982). Le F1,6PP est ensuite scindé en deux unités C_3 : glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) et dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) grâce à une triose-phosphate isomérase. Une molécule de NAD^+ est ensuite réduite par la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase pour former à partir du DHAP et du G3P du 1,3-bisphosphoglycérate. Cette enzyme a été mise en évidence par Miller en 1978 chez *F.s.*. Deux molécules d'ATP sont générées durant l'oxydation du 1,3-bisphospho-glycérate en pyruvate par un mécanisme lié au substrat. Cette synthèse d'ATP est catalysée par deux kinases : la 3-phosphoglycérate kinase et la pyruvate kinase.

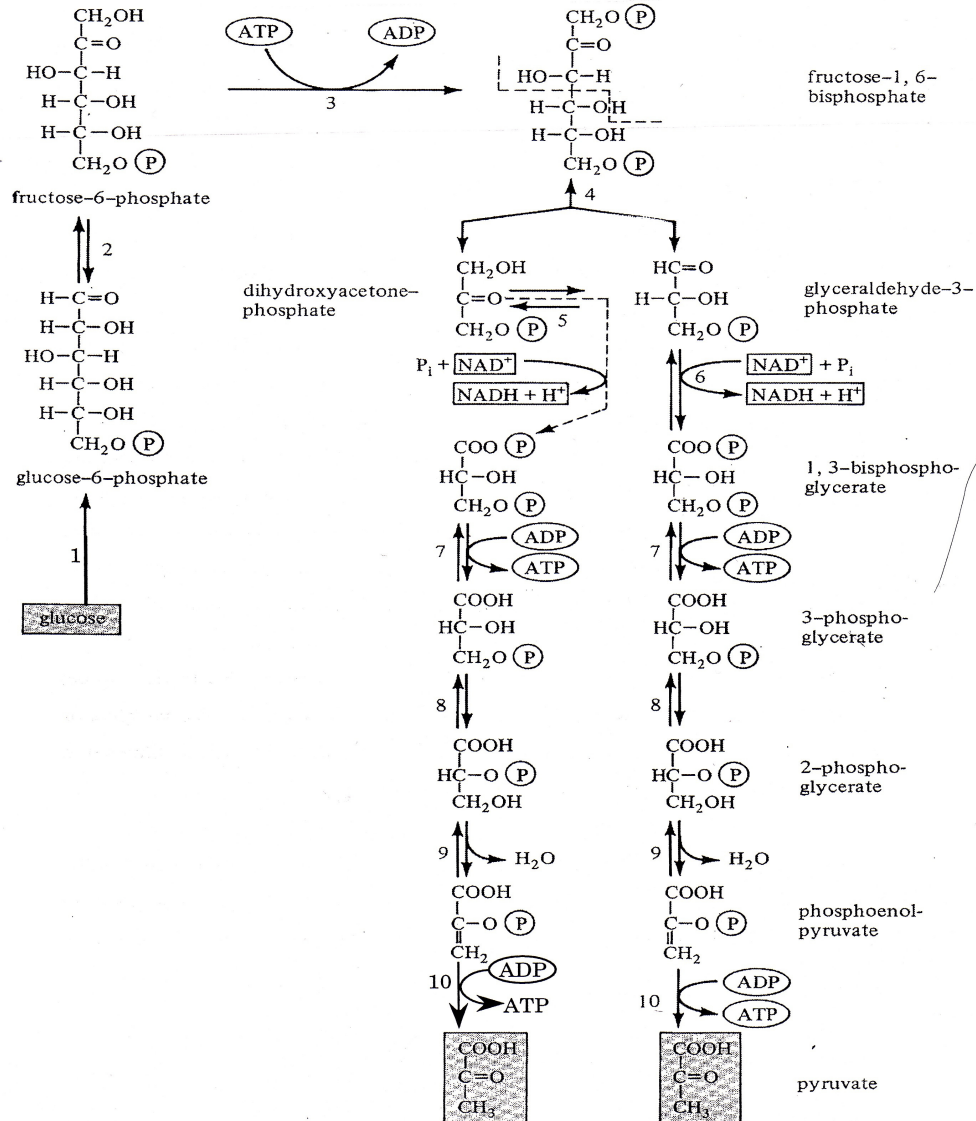


Figure I.20 : Voie Embden-Meyerhof-Parnas d'après Gottschalk (1986),

1 : Glucokinase, 2 : Glucose phosphate isomérase, 3 : Phosphofructokinase, 4 : Fructose biphosphate aldolase, 5 : Triose phosphate isomérase, 6 : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogénase, 7 : 3-phosphoglycérate kinase, 8 : Phosphoglycérate mutase, 9 : Enolase, 10 : Pyruvate kinase.

4.5.4 Formation de l'acétate

Le pyruvate (Figure I.21) est oxydé et clivé en CO₂ et acétyl-CoA, lui-même transformé en acétyl-phosphate par une phosphotransacétylase. Cette oxydation semble être couplée à la réduction d'un couple redox (Miller, 1978). Meinhart et Glass (1994a) montrent en effet que

cette oxydation est couplée à la réduction du fumarate en succinate par l'intermédiaire des cytochromes b560.

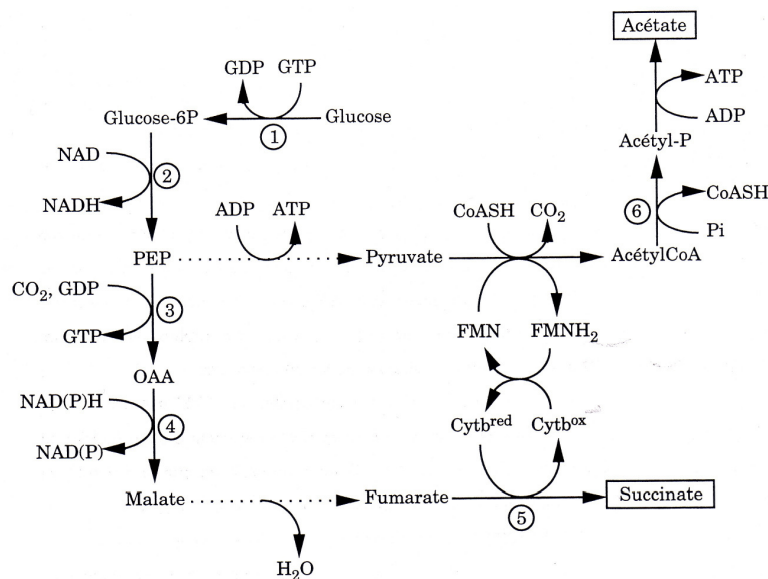


Figure I.21 : Voies de formation de l'acétate et du succinate d'après Miller (1978)

1 : Glucokinase, 2 : voie d'EMP, 3 : PEP carboxykinase, 4 : Malate déshydrogénase, 5 : Fumarate réductase, 6 : Phosphotransacétylase.

4.5.5 Formation du succinate

Miller (1978) montre que *Fibrobacter succinogenes* produit majoritairement du succinate. De l'oxaloacétate (OAA) est formé à partir du phosphoénol-pyruvate (Figure I.21) de la voie EMP par une PEP-carboxykinase fonctionnant avec le GDP comme accepteur de phosphate. Le NADH formé de la glycolyse (ou voie EMP) est oxydé pendant la réduction de l'oxaloacétate en malate. Celui-ci est converti en fumarate par une fumarase dont la présence n'a pas été mise en évidence. En parallèle, le pyruvate est formé à partir du phosphoénol-pyruvate. Les réactions de transformation du pyruvate et fumarate en acétyl-CoA et succinate respectivement sont couplées. Les électrons générés par l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA sont utilisés pour la réduction du fumarate en succinate par une fumarate réductase (Miller, 1978 ; Weimer, 1993). La fumarate réductase, dans ce cas, agit comme un accepteur terminal pour une chaîne de transporteurs d'électrons. Ce couplage peut se réaliser grâce à deux réactions d'oxydoréduction mettant en jeu un cytochrome b et un système FMN (Flavine mono nucléotide). Chez *F.s.* l'existence d'un cytochrome b fonctionnant comme transporteur

d'électrons pour la fumarate réductase a été démontré par Thauer *et al.* (1977). Le cytochrome b (b583) détecté par Meinhard et Glass (1994a) dans la membrane de *F.s.* paraît fonctionner comme un transporteur d'électrons entre le NADH et le fumarate. Miller (1978) propose également que la fumarate réductase soit couplée à l'oxydation du pyruvate à travers un système à flavine où le FMNH₂ sert de donneur d'électrons. Une dithionite couplée à l'activité fumarate réductase (Joyner et Baldwin, 1966 ; Miller, 1978) semble être également présente chez *F.s.*.

Plus récemment, Meinhard et Glass (1994a) ont démontré la présence d'une activité NADH décyubiquinone oxydoréductase et d'une activité NADH/fumarate réductase dans la membrane de *F.s.*. La NADH/fumarate réductase de *F.s.* possède plusieurs propriétés qui semblent la distinguer des autres systèmes bactériens. En effet, Meinhard et Glass (1994b) montrent l'existence d'un effet combiné unique de NaCl et du pH sur la fumarate réductase de *F.s.*. Ceci reflète la création d'un environnement ionique favorable pour cette enzyme.

La figure I.21 montre un rapport de production du succinate et d'acétate de 1 ; or, selon Matheron (1997) et Matheron *et al.* (1998), ce rapport est de 3,7 pour des cellules en croissance et de 3,9 pour des cellules au repos. De plus, la présence d'éléments des chaînes de transport d'électrons tels que des cytochromes b, des flavines, des nucléotides, de NAD⁺ ainsi que la présence d'une fumarate réductase membranaire (Meinhard et Glass, 1994a) chez *F.s.* suggère qu'un autre mécanisme intervient dans la formation de succinate chez *F.s.* comme chez *Wolinella succinogenes*.

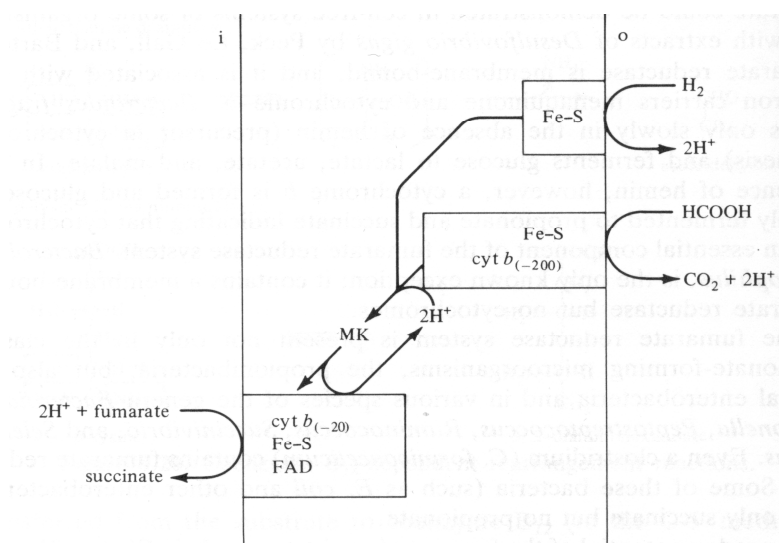


Figure I.22 : Voies de formation du succinate d'après Gottschalk (1986).

Chez cette bactérie (Figure I.22), il a été montré l'existence d'une chaîne de transport d'électrons où le formiate et l'hydrogène sont des donneurs d'électrons et où le fumarate est l'accepteur final. L'énergie, produite par le flux d'électrons circulant à partir des donneurs à potentiel redox négatif vers des accepteurs à potentiels redox plus positifs, est utilisée pour la synthèse d'ATP. Ce flux d'électrons est initié par la fumarate réductase membranaire qui permet la formation de succinate. La formation de succinate est donc couplée à une formation d'ATP.

4.5.6 Formation du formiate

Il est possible que *Fibrobacter succinogenes* puisse réduire le CO₂ en formiate par une formiate déhydrogénase fonctionnent avec un donneur d'électron de type NADH comme le font certaines bactéries acétogènes (Miller, 1978). Le formiate peut également résulter de l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA par une pyruvate-formiate-lyase comme rencontrée chez *E. coli* en anaérobiose (Wong *et al.*, 1993). Cependant, ceci est en contradiction avec les études de Miller (1978), et rien ne permet de conclure sur l'origine du formiate dans les extraits de *F.s.*.

4.5.7 Stockage du glycogène

Parallèlement au métabolisme du glucose exogène, *Fibrobacter succinogenes* est capable de stocker et de dégrader le glycogène intracellulaire. Ce stockage pourrait permettre aux bactéries de se maintenir dans le rumen en absence de substrat métabolisable (Wells et Russel, 1994). Des études biochimiques et d'ultrastructure ont révélé l'existence effective d'un stockage de glycogène dans le cytoplasme des cellules de *F.s.*. Ce stockage est notamment observé chez les cellules jeunes et peut représenter jusqu'à 70% du poids sec de la biomasse (Steward *et al.*, 1981 ; Gaudet et Gaillard, 1987). De nombreux granules cytoplasmiques ont été observés en microscopie électronique sur des coupes de cellules. Ces granules isolés par Gong et Forsberg (1993) apparaissent en paires et de tailles variant de 32 à 45 nm de diamètre. Des réserves de glycogène sont présentes chez les bactéries adhérentes à

la cellulose, donc durant sa dégradation, mais également chez des bactéries non adhérentes (Gaudet et Gaillard, 1987).

La synthèse de glycogène peut s'expliquer par une réversion d'une partie des partenaires glycolytiques en présence d'une forte concentration de glucose (Gaudet *et al.*, 1992).

La synthèse de glycogène chez *F.s.* est observée durant toutes les phases de croissance et reste stable durant la phase de croissance linéaire quand le glucose exogène est disponible (Gaudet *et al.*, 1992). Ceci est en désaccord avec ce qui est habituellement observé chez un grand nombre de bactéries pour lesquelles l'accumulation de glycogène se fait pendant des périodes de croissance lente ou en cas d'absence de croissance (Wallace, 1980). De même *F.s.* est capable d'accumuler le glycogène pendant la phase de croissance exponentielle (Gaudet *et al.*, 1992 ; Matheron *et al.*, 1998), alors que la plupart des bactéries accumule le glycogène quand l'ammoniaque est limitant (Matheron *et al.*, 1998).

De plus, Gaudet *et al.* (1992) ont mis en évidence l'existence d'un cycle futile du glycogène, c'est-à-dire que la bactérie métabolise simultanément ses réserves de glycogène endogène et une source de glucose exogène (Gaudet *et al.*, 1992). Cette particularité suggère une dérégulation au niveau des enzymes intervenant dans la synthèse du glycogène (Matheron *et al.*, 1997).

Enfin, il paraît possible que *F.s.* soit capable de dissiper son énergie dans la production de cellodextrine. Quand la concentration en sucre extracellulaire est importante, une partie de ce sucre peut être relargué sous forme de cellodextrine dans le milieu extérieur (Wells *et al.*, 1995). Ces cellodextrines peuvent constituer dans le rumen une source d'énergie pour les bactéries non cellulolytiques. Wells *et al.*, (1995) ont montré que les cellules de *F.s.* sur glucose ou cellobiose synthétisent et excrètent des cellodextrines vers le milieu extérieur. Il existe trois hypothèses pour la formation de cellodextrines : une enzyme localisée dans l'espace périplasmique clive les cello-oligosaccharides (Huang et Forsberg, 1987), la réaction de transglucosylation est catalysée par une β -glucosidase constitutive (Forsberg *et al.*, 1994), la réaction inverse d'une phosphorylase est possible (Wells *et al.*, 1995). De même il semble que *F.s.* soit capable de synthétiser des maltodextrines à partir du glycogène (Matulova *et al.*, 2001). Deux mécanismes sont proposés pour cette synthèse chez *E. coli* : la réaction de dégradation du glycogène en glucose-1-phosphate puis en maltose est catalysée par une phosphorylase maltose/maltotriose inverse (Dekker, 1993), une enzyme clive le glycogène en maltotriose et allonge la chaîne pour obtenir des maltodextrines (Boss et Shuman, 1998).

4.6 Dégradation des substrats lignocellulosiques : activité cellulolytique

De nombreuses études visant à purifier les enzymes et à déterminer leurs propriétés ont déjà été menées : les enzymes sont classées en fonction de leur substrat et selon leur mode d'action. On distingue des cellulases et des hémicellulases qui dégradent respectivement la cellulose et les hémicelluloses.

Cette partie vise à compléter les données générales du paragraphe 1.4 en précisant les capacités enzymatiques propres à *F.s.*.

4.6.1 Les cellulases

Différentes enzymes sont regroupées sous le terme de cellulases. Les cellulases désignent toute enzyme capable de dégrader la cellulose et ses dérivés. Deux grands groupes de cellulases se distinguent : des exoglucanases et des endoglucanases qui hydrolysent respectivement la cellulose à ses extrémités ou à l'intérieur de la chaîne cellulosique.

Fibrobacter succinogenes S85 est la plus efficace pour dégrader la cellulose cristalline ; cependant, aucune des cellulases isolées n'est capable d'hydrolyser ce substrat *in vitro*. Une organisation supramoléculaire ($> 4.10^3$ kDa) des enzymes expliquerait un tel résultat. Ce complexe appelé cellulosome est présent dans les fractions membranaires et dans les milieux extracellulaires de cultures sur cellulose (Schellhorn et Forsberg, 1984). Par contre, il a été observé que les cellulosomes isolés ne peuvent hydrolyser la cellulose cristalline ; seule la bactérie vivante en est capable (Figure I.23) (Lynd *et al.*, 2002).

La partie amorphe de la cellulose est plus facilement dégradable par les enzymes car les fibres sont plus relâchées que dans la partie cristalline. Les endoglucanases peuvent donc plus facilement attaquer au niveau de la cellulose amorphe créant ainsi des extrémités libres qui sont à leur tour attaquées par les exoglucanases (Lynd *et al.*, 2002).

Beaucoup de cellulases sont composées de domaines d'adhésion à la cellulose (CBD) liés à un domaine catalytique (CD) par des séquences d'acides aminés hydroxylés (Tomme *et al.*, 1995b). La principale fonction des CBD semble être d'augmenter la concentration effective d'enzymes sur les substrats insolubles (Warren, 1996).

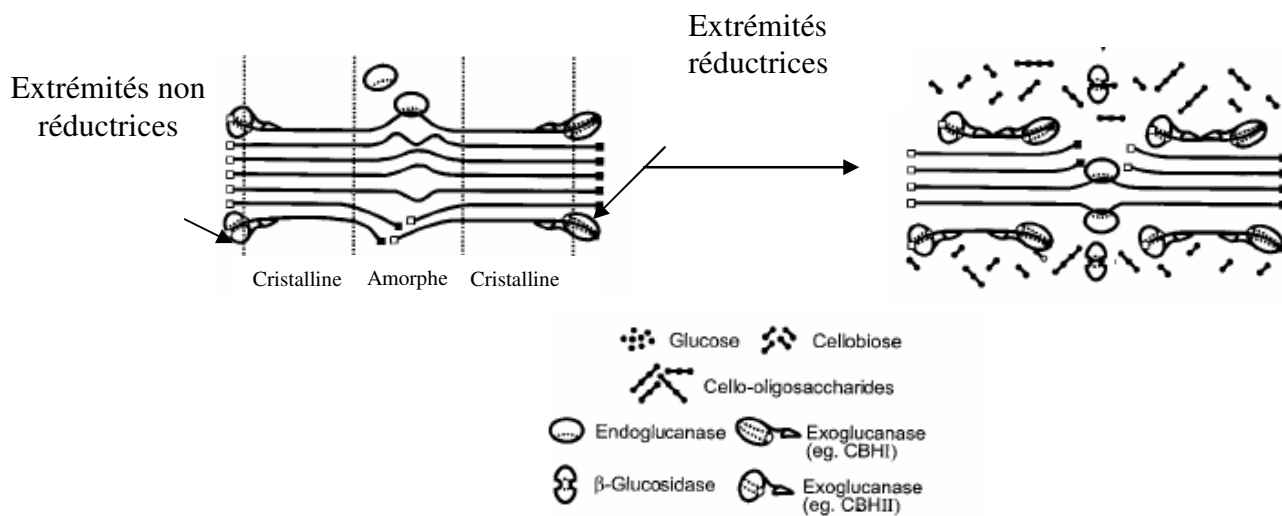


Figure I.23 : Dégradation de la cellulose cristalline et amorphe par les enzymes cellulolytiques de *Fibrobacter succinogenes* d'après Lynd *et al.* (2002).

4.6.1.1 Les endoglucanases

Les endoglucanases sont des cellulases qui hydrolysent les liaisons β -1,4 glycosidiques de façon aléatoire à l'intérieur de la chaîne de cellulose, formant ainsi du glucose, du cellobiose et des cellodextrines.

4.6.1.1.1 Endoglucanases 1, 2 et 3

EG1 est une protéine de poids moléculaire 65 kDa, son point isoélectrique est de 4,8, son pH optimal est de 6,4 et sa température optimale est de 39°C (soit environ la température du rumen) (McGavin et Forsberg, 1988). Elle possède un spectre d'action assez large et agit sur la carboxy-méthyl-cellulose (CMC), la lichénane, la cellulose amorphe et le β -glucane, formant majoritairement du cellobiose et du cellotriose (McGavin et Forsberg, 1988). Le cellobiose inhibe l'activité de l'enzyme par un rétrocontrôle négatif, mais d'autres molécules peuvent moduler l'activité de EG1. En effet, l'enzyme est activée par les ions calcium et magnésium et inhibée par les ions mercure, les ions cuivre et par l'EDTA (chélateur de cations bivalents Mg^{2+} et Ca^{2+}). EG1 est constitutive (McGavin *et al.*, 1990).

EG2 est une protéine de poids moléculaire 118 kDa, son point isoélectrique est de 9,4, son pH optimal est de 5,8 et sa température optimale est de 39°C (McGavin *et al.*, 1990). À l'inverse

de EG1, elle n'agit que sur la CMC et la lichénane, formant du cellotétraose et du cellotriose (McGavin et Forsberg, 1988). Cette enzyme est également inhibée par l'EDTA. Elle possède différentes conformations qui lui permettent, soit d'être fixée à la cellulose, soit de rester fixer sur la membrane externe.

EG3 donne les mêmes produits de dégradation que EG2 (McGavin et Forsberg, 1989). Elle hydrolyse la CMC, le β -glucane, et la cellulose amorphe (McGavin *et al.*, 1990). La présence de EG3 sur les cellules et en extracellulaire peut révéler la présence d'un peptide signal lipoprotéique de sécrétion. En effet, EG3 se situe sur la face externe de la membrane pendant la phase de croissance exponentielle mais est progressivement libérée dans le milieu extracellulaire (McGavin *et al.*, 1990).

L'activité enzymatique des endoglucanases varie en fonction de la composition du milieu de culture de la bactérie. L'activité spécifique des endoglucanases est la même sur milieu avec glucose ou cellobiose mais elle est deux fois plus élevée sur milieu avec cellulose. La cellulose augmente donc l'expression des endoglucanases (McGavin *et al.*, 1990).

Lors de cultures sur glucose ou cellobiose, l'activité endoglucanase est essentiellement associée à la membrane, cependant EG1 et EG3 sont spécifiquement sécrétées pendant la phase de croissance sur ces sucres. En présence de cellulose, la distribution des activités endoglucanases change et il y a autant d'activité associée à la membrane que d'activité extracellulaire : ainsi la cellulose semble déclencher la sécrétion d'endoglucanases (McGavin *et al.*, 1990). EG2 n'est pas sécrétée en présence de glucose ou de cellobiose et n'apparaît pas dans le surnageant de culture sur cellulose mais est très abondante à la surface de la cellulose. Cette enzyme semble donc être présente uniquement chez les cellules adhérentes à la cellulose (McGavin et Forsberg, 1988) et non relarguée dans le milieu extracellulaire. EG2 est donc la seule qui soit vraiment associée à la membrane cellulaire (McGavin *et al.*, 1990).

4.6.1.1.2 Endoglucanases B, C, et D

EGD clive le β -glucane et la CMC, ce qui provoque une diminution rapide de la viscosité du milieu ; le cellobiose est clivé en glucose (Malburg *et al.*, 1996).

Béra-Maillet *et al.* (2000a) ont caractérisé deux autres endoglucanases EGC et EGB. **EGC** et **EGB** possèdent une activité CMCase stimulée par les cations divalent Ca^{2+} et Mg^{2+} . Ces deux enzymes possèdent de nombreuses propriétés communes mais leur mode d'action et leur spécificité à la CMC sont différents (Béra-Maillet *et al.*, 2000a). Ceci montre une action

complémentaire pour la dégradation de la cellulose. Cette activité CMCase est cellulaire et augmente en présence de cellulose, ce qui suggère que la synthèse de ces endoglucanases est induite par les substrats (Béra-Maillet *et al.*, 2000b).

4.6.1.2 Exoglucanases

Les exoglucanases sont des cellulases qui hydrolysent les extrémités de la chaîne de cellulose formant ainsi du cellobiose.

4.6.1.2.1 Les cellodextrinases

Les cellodextrinases sont des protéines de poids moléculaire de 42 kDa, leur point isoélectrique est de 4,9, leur pH optimal de 6,5 et leur température optimale de 55°C. Les substrats pouvant être dégradés par ces enzymes sont le méthylumbelliferylcellobiose, le méthylumbelliferylglucose et le pNP-glucose (Gong *et al.*, 1989). Il existe plusieurs cellodextrinases et l'une d'entre elles a été purifiée de *F.s.* : elle dégrade le cellotriose et les oligosaccharides en cellobiose (activité exohydrolytique).

Dans le processus de dégradation, la cellodextrinase, qui est toujours périplasmique (Huang et Forsberg, 1987), intervient donc après les glucanases. L'expression du gène est inhibée lors de la culture sur glucose et non induite par le cellobiose (Gong *et al.*, 1989).

4.6.1.2.2 Les cellobiosidases (cellobiohydrolases)

Il existe deux cellobiosidases ; l'une, extracellulaire (poids moléculaire 75 kDa, point isoélectrique 6,7, pH optimal 6,2, température optimale comprise entre 39°C et 45°C), est stimulée par le chlore (Huang et Forsberg, 1990) et produite de façon constitutive ; l'autre, non stimulée par le chlore, est principalement périplasmique. Elles scindent les extrémités de la cellulose en produisant du cellobiose. Les CBH, qui sont des exocellulases, se fixent à l'extrémité C4 des molécules de cellulose pour initier la dégradation. Globalement, 90% de l'activité cellobiosidase reste associée aux cellules (Huang et Forsberg, 1990).

Contrairement aux endoglucanases, ces enzymes sont capables de dégrader faiblement la cellulose cristalline. De plus, elles agissent sur la CMC, la lichénane, le pNP- β -D-glucose et le xylane (Huang et Forsberg, 1990).

4.6.1.3 Les β -glucosidases (cellobiases)

Leur pH optimal est de l'ordre de 7 et leur température optimale d'action est de 40°C. Elles coupent la molécule de cellobiose pour donner deux glucoses et sont stimulées par la présence de cellobiose (Buchanan et Mitchell, 1992). En ce qui concerne leur localisation, les cellobiases sont cytoplasmiques ou insérées dans la membrane interne.

4.6.2 Les hémicellulases

Les hémicellulases sont des enzymes capables de dégrader l'hémicellulose tel que le xylane ; dans ce cas il s'agit alors de xylanases. Ces enzymes sont présentes chez un grand nombre de micro-organismes. Par contre, les mammifères ne possèdent pas cette forme d'enzyme (Lynd *et al.*, 2002). La dégradation d'hémicellulose nécessite l'action d'autant d'enzymes qu'il y a de ramifications différentes :

- acétylestérase : coupe entre le carbone 3 d'un résidu xylopyranosyl et d'un branchement acétyle,
- α -L-arabinofuranosidase : coupe entre le carbone 3 d'un résidu xylopyranosyl et d'un résidu α -arabinofuranosyl,
- α -glucuronidase : coupe entre le carbone 2 d'un résidu xylopyranosyl et le résidu glucuronosyl,
- endo-1,4- β -xylanase : coupe à l'intérieur de la chaîne principale,
- β -xylosidase : coupe à l'extrémité de la chaîne principale.

Chez *F.s.*, la glucuronidase agit une fois que l'endoxylanase a coupé la molécule en morceaux de faible poids moléculaire. En effet, la glucuronidase isolée de *F.s.* est plus active sur des chaînes de faible taille. De plus, les ramifications de la chaîne principale d'hémicellulose diminuent l'accessibilité de cette dernière pour les xylanases (Smith et Forsberg, 1991). Il

existe donc une synergie entre les xylanases et l' α -glucuronidase qui permet une dégradation plus rapide des polymères de la paroi végétale.

Smitt et Forsberg (1991) isolent pour la première fois chez *F.s.* une α -glucuronidase. Cette enzyme présente également chez *Trichoderma reesi* (Dekker, 1983) ou chez *Aspergillus niger* (Johnson *et al.*, 1989) permet d'augmenter l'activité hydrolytique de *F.s.* en participant à la colonisation et à la dégradation des parois végétales (Dehority et Scott, 1967 ; Akin, 1989 ; Stewart et Flint, 1989).

F.s. possède également quatre gènes uniques (une seule copie de gènes) codant pour des xylanases (Malburg *et al.*, 1994). Deux de ces gènes correspondent aux activités typiques des endoxylanases produisant du xylobiose, du xylotriose et du xylootetraose (Zhu *et al.*, 1994). Ces deux endoxylanases (EX1 et EX2) identifiées chez *F.s.* sont stimulées par le magnésium (Gong *et al.*, 1989) et sont majoritairement extracellulaires.

L'endoxylanase 1 (**EX1**) est capable de cliver les substituants arabinoses des hétéroxylanes, avant l'hydrolyse de la chaîne principale en xylooligosaccharides. Cette activité contribue à l'activité globale α -L-arabinofuranosidase de *F.s.* et est probablement spécifique aux xylanes très substitués (Matte et Forsberg, 1992). L'endoxylanase 1 est donc une enzyme débranchante coupant au niveau des zones de branchement ou à proximité. La capacité de *F.s.* à synthétiser une enzyme pouvant à la fois débrancher et hydrolyser le squelette de xylane, explique son aptitude élevée à dégrader l'hémicellulose (Matte et Forsberg, 1992). Elle est inhibée par de fortes concentrations en substrat.

L'endoxylanase 2 (**EX2**) a un poids moléculaire de 66 kDa, un point isoélectrique de 8, un pH optimal de 6,3 et une température optimale de l'ordre de 55°C (Gong *et al.*, 1989). EX2 n'hydrolyse pas les substituants arabinose des hétéroxylanes et appartient à la classe des enzymes non débranchantes (Dekker, 1976, 1985). Elle dégrade l'arabinoxylane, la CMC et le xylane.

Le troisième gène (**XynB**) possède une activité endoglucanase et une activité xylanase (Zhu *et al.*, 1994).

Le dernier gène **XynC** (Paradis *et al.*, 1993 ; Zhu *et al.*, 1994), correspond à une exoxylanase qui hydrolyse le xylane avec production d'une grande quantité de xylose et de xylobiose, et qui montre une synergie avec une α -glucuronidase (Smitt et Forsberg, 1991). Trois domaines ont été mis en évidence : A, B et C. Les domaines A et B possèdent un site actif et fonctionnel

d'hydrolyse du xylane (Paradis *et al.*, 1993). Ils sont actifs séparément et même s'ils présentent des similarités, ils n'ont pas des propriétés totalement identiques. Paradis *et al.* (1993) montrent que le domaine A possède une affinité plus grande pour le xylane que le domaine B, ce qui suggère que A est plus adhérent aux substituants du xylane que B. Le domaine C ne possède pas d'activité enzymatique.

Enfin *F.s.* possède une enzyme résistante au froid, CelG, isolée par Iyo et Forsberg (1999). Cette enzyme est capable de maintenir 70% de son activité à 0°C.

4.6.3 Mode d'action et localisation des enzymes

Le mode d'action de chaque enzyme est particulier mais certaines peuvent agir en synergie afin de dégrader des polymères pariétaux de façon optimale (Forsberg *et al.*, 1984). La cellulose est dégradée à la surface des cellules pour relarguer du glucose et du cellobiose dans le cytoplasme (Huang et Forsberg, 1987). Ensuite, des acétyl-xylanes et des arabinofuranosidases sont produits (McDermid *et al.*, 1990). Ces composés sont nécessaires pour cliver les ponts diesters entre les hémicelluloses et la lignine, ou pour débrancher les xylanes des chaînes d'hémicelluloses. Finalement, plusieurs xylanases et glucuronidases viennent compléter le système cellulolytique (Smith et Forsberg, 1991 ; Malburg *et al.*, 1992).

La localisation de ces enzymes n'est pas connue de façon précise mais il semblerait que les cellulases se trouvent sur la membrane externe des bactéries (Fonty et Forano, 1999), ou excrétées dans le milieu de culture. Il en est de même pour les xylanases et les enzymes débranchantes (xylanes) (Forsberg *et al.*, 1994), alors que les cellodextrinases ont une localisation périplasmique (Huang et Forsberg, 1987).

4.7 Conclusion

➤ Caractéristiques générales

- *Fibrobacter succinogenes* S85 a été isolée à partir du rumen de bovin. C'est un bacille pléomorphe (0,3-1,6 x 0,8-1,6 μm), Gram négatif, non pigmenté et anaérobie stricte.
- Cette bactérie a une croissance optimale à une température de 39°C, un pH de 6 et un potentiel d'oxydoréduction faible (-330 mV). Le milieu doit contenir de l'ammoniaque, du valérate, de l'isobutyrate, de la biotine, de l'acide para aminobenzoïque, certains ions comme Na^+ , K^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} , du phosphate et du carbonate.
- Cette bactérie est la plus active pour la digestion de la cellulose cristalline et la plus performante sur régime riche en substrat difficile à dégrader et dégrade également très efficacement les hémicelluloses, particulièrement le xylane. Cependant, pour une dégradation efficace une adhésion très étroite de cette bactérie au substrat est nécessaire, soit par l'intermédiaire d'enzymes de surface, soit par l'intervention d'adhésine ou encore par des interactions ioniques non spécifiques.

➤ Métabolisme

- *Fibrobacter succinogenes* utilise la cellulose, le glucose ou le cellobiose comme source d'énergie et de carbone et l'ammoniaque comme seule source d'azote. Le cellobiose et le glucose sont incorporés simultanément lorsque *Fibrobacter succinogenes* est cultivée sur ces deux sucres. Ces deux sucres sont transportés dans la cellule par deux mécanismes de transports actifs distincts dont la synthèse est constitutive. Le transport du glucose se fait en symport Na^+ dépendant et celui du cellobiose par une perméase Na^+ dépendante.
- Elle fermente principalement les hexoses par la voie Embden-Meyerhof-Parnas mais elle peut également métaboliser le glucose par la voie des pentoses phosphates.
- Les hexoses sont fermentés pour donner du succinate, de l'acétate et du CO_2 à partir du pyruvate de la voie EMP, et du formiate.
- Parallèlement au métabolisme du glucose exogène, *Fibrobacter succinogenes* est capable de dégrader et stocker le glycogène intracellulaire afin de permettre aux bactéries de se maintenir dans le rumen en absence de substrat métabolisable.

➤ Dégradation des parois végétales

Fibrobacter succinogenes possède un équipement enzymatique complet et complexe.

- Cet équipement contient des endoglucanases (EG1, 2, 3, B, C et D), des exoglucanases (cellodextrinases, cellobiosidases et β -glucosidases) et des hémicellulases (endoxylanases, exoxylanases, glucuronidases, xylanases et estérases).
- Leurs modes d'action sont différents mais elles peuvent agir en synergie afin de dégrader des polymères pariétaux de façon optimale. La localisation de ces enzymes n'est pas connue de façon précise mais il semblerait que les cellulases et les xylanases se trouvent sur la membrane externe des bactéries ou excrétées dans le milieu de culture alors que les cellodextrinases ont une localisation périplasmique.

5 UTILISATION DE *FIBROBACTER SUCCINOGENES* DANS LE CONTEXTE MELISSA

5.1 Introduction

Pour que des hommes puissent un jour effectuer des missions spatiales durant une longue période, notamment sur Mars, il est nécessaire de concevoir un système capable de recycler les déchets et de produire les aliments et l'oxygène nécessaire à la vie des cosmonautes. L'Agence Spatiale Européenne (ESA) s'intéresse à ce concept d'écosystème clos et développe un écosystème de support-vie biogénératif nommé MELiSSA (Micro-Ecological Life Support Alternative). Les études sur les systèmes « support-vie » montrent en effet que, si les fonctions du système doivent inclure la production de nourriture, il est indispensable de mettre en place un compartiment de production de plantes supérieures, ce qui impose par ailleurs d'avoir recours à des procédés biologiques de traitement des effluents. Ainsi, de proche en proche, les systèmes de support-vie les plus complets (taux de recyclage les plus élevés) sont des systèmes biologiques qui recréent les conditions d'un écosystème artificiel.

Une des étapes critiques de ce projet est la dégradation des déchets issus de l'alimentation des cosmonautes. Cette dégradation est effectuée par le premier compartiment (CI) de la boucle MELiSSA. Cependant une technologie alternative a été développée faisant appel à trois procédés de dégradation de déchets végétaux dont celui utilisant *Fibrobacter succinogenes*. En effet, *F.s.* a été sélectionnée pour ses capacités à dégrader les résidus cellulosiques. Ces potentialités sont utilisées afin de compléter un système de recyclage des déchets, après une étape de prétraitement par biométhanogenèse et avant une étape physico-chimique de dégradation (haute pression / haute température).

Ces procédés sont présentés brièvement dans le paragraphe suivant ainsi que le concept de l'écosystème clos MELiSSA.

5.2 Généralités

Depuis de nombreuses années, les principales agences spatiales internationales investissent dans la recherche sur les écosystèmes clos artificiels en tant que support de vie pour des missions habitées de longues durées ou par exemple pour des bases permanentes sur la lune

ou sur Mars. De tels systèmes comportent de nombreuses étapes de transformation de la matière. De façon générale, tous les écosystèmes artificiels fonctionnent en deux étapes que l'on observe déjà dans un écosystème naturel. La première phase est une phase « d'hydrolyse » des déchets, où les macromolécules sont oxydées en dioxyde de carbone et en nitrate et décomposées en monomères simples. Les étapes de transformation peuvent être réalisées par voie purement physico-chimique (avec une très grande efficacité mais des conditions de température et de pression très sévères et la possibilité de synthèse de sous-produits non recyclables) ou par voie biologique (avec une plus faible efficacité mais dans des conditions ambiantes de température et pression et la possibilité du bouclage complet des flux de matière). La seconde phase est une phase de « synthèse » destinée à régénérer de l'oxygène par photohydrolyse de l'eau et à régénérer de la nourriture par photosynthèse à partir des minéraux précédents, de l'eau et du dioxyde de carbone. Cette phase est biologique.

L'idée directrice de la nouvelle génération des L.S.S. (Life Support System) est de créer un écosystème artificiel par la régénération des consommables. Les programmes Européens et Russes sont nommés C.E.S. (Closed Ecological System), ceux des Américains C.E.L.S.S. (Controlled Ecological Life Support System) (Mac Elroy, 1990). Le projet MELiSSA (Micro Ecological Life Support System Alternative) est le premier modèle d'étude d'un C.E.L.S.S. développé par l'Agence Spatiale Européenne (ESA). Son originalité repose sur le fait qu'il est majoritairement basé sur l'utilisation de micro-organismes.

5.3 Le concept MELiSSA

Ce projet a pour but de créer un écosystème artificiel autonome permettant le recyclage des déchets organiques, du CO₂ et des minéraux sous forme d'une biomasse consommable et utilisant la lumière comme source d'énergie pour la photosynthèse (Mergeay *et al.*, 1988). De ce projet coordonné par l'ESA (European Space Agency), s'est établie une collaboration entre différents partenaires : les universités de Ghent (Belgique), Blaise Pascal (Clermont-Ferrand), Autònoma de Barcelona (Espagne), de Hambourg (Allemagne) et de Guelph (Canada), ainsi que les sociétés VITO, EPAS, SCK (Belgique) et SHERPA (France). Des entreprises privées telles que TNO Leiden (Pays Bas) et NTE (Espagne) contribuent également à cette

collaboration. L'ensemble du projet et la mise en place progressive de la boucle MELiSSA sont gérés par la section Support de Vie et Habitabilité de l'ESTEC. Chaque année, les objectifs et les travaux des contractants sont redéfinis en fonction de l'évolution du projet. Chaque étude donne suite à la rédaction d'une note technique destinée à l'ESA et aux différents partenaires du projet.

L'originalité de l'approche envisagée dans ce projet d'écosystème clos artificiel repose sur le fait que le nombre d'étapes nécessaires au cycle de la matière a été réduit au minimum. En effet cet écosystème, défini comme une boucle (Figure I.24) ne comporte que 4 grandes étapes de transformation de la matière autour d'un compartiment consommateur (équipage) qui produit les déchets solides, liquides et gazeux. Ceci a été rendu possible car cette boucle est basée uniquement sur des étapes essentiellement biologiques faisant appel à des bioréacteurs afin de contrôler et de garantir une efficacité de recyclage importante.

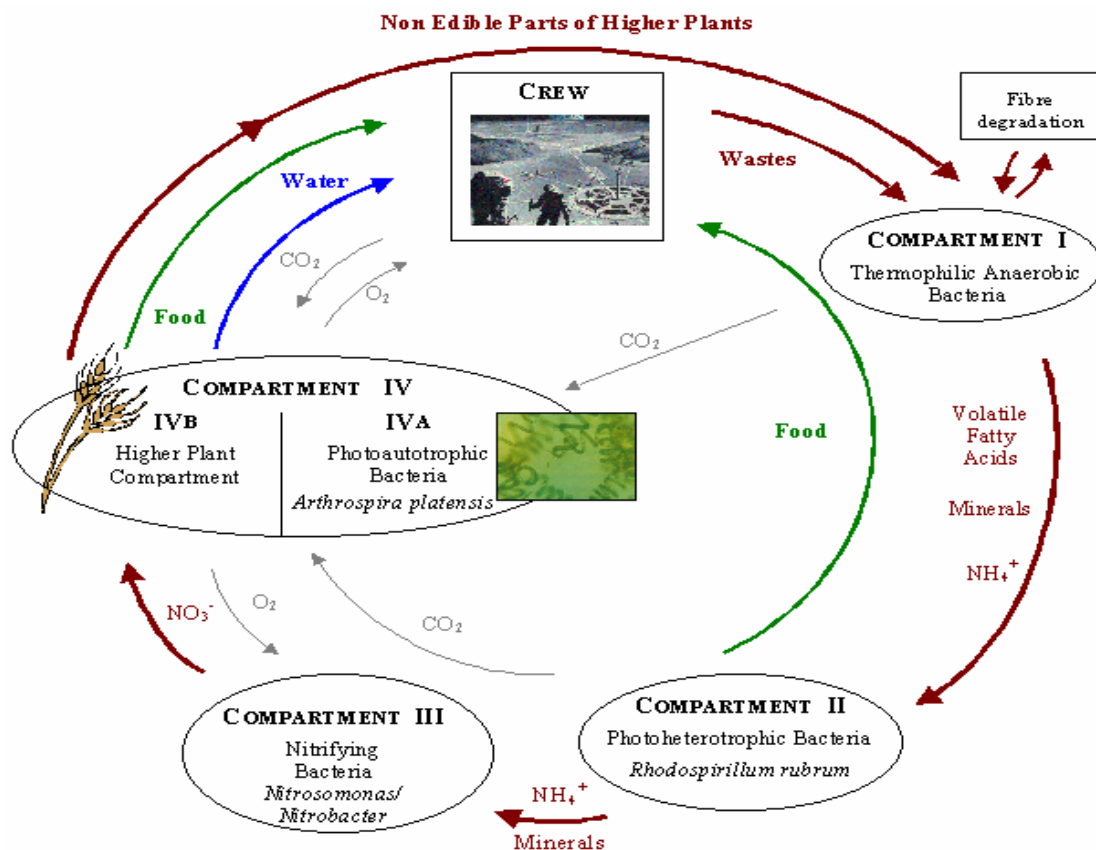


Figure I.24 : Boucle MELiSSA d'après Lasseur et Paillé (2000).

Le compartiment liquéfacteur (I) a pour objectif de solubiliser les déchets engendrés par l'équipage (fèces, déchets végétaux...etc.). Il est composé d'un consortium de bactéries anaérobies qui vont produire durant le processus de dégradation, des acides gras volatils, de l'ammonium et du CO₂. Les AGV et l'ammonium sont métabolisés par les bactéries du second compartiment tandis que le CO₂ sert de source de carbone au quatrième compartiment.

Le compartiment photohétérotrophe (II) utilise le micro-organisme *Rhodospirillum rubrum*. Il est responsable de la transformation des acides gras volatils, produits par le compartiment I, en CO₂ et en protéines à hautes valeurs nutritives.

Le compartiment nitrificateur (III) est constitué de deux types de bactéries nitrifiantes : *Nitrobacter* et *Nitrosomonas*. Elles permettent de transformer une partie de l'ammoniaque (NH₃) en nitrate (NO₃⁻) pour obtenir une source d'azote assimilable par les micro-organismes photosynthétiques du dernier compartiment.

Le compartiment photosynthétique (IV) est divisé en deux sous compartiments : bactéries photoautotrophes (IV a) et plantes supérieures (IV b). Il assure trois fonctions essentielles : la production d'oxygène (régénération de l'atmosphère), la production de la biomasse consommable destinée à l'équipage (à l'aide de plantes supérieures) et l'élimination du CO₂ dégagé par le compartiment consommateur et le compartiment liquéfacteur. Le compartiment IV a est colonisé par la cyanobactérie *Arthrospira platensis*. Le choix des plantes supérieures cultivées dans le compartiment IV b dépend de la ration alimentaire fournie à l'équipage. Typiquement et à titre expérimental on suppose qu'il comporte 10 plantes supérieures : pomme de terre, laitue, soja, tomate, chou, blé, betterave, oignon, riz et épinard dont trois ont été sélectionnées pour l'étude du compartiment I.

Le compartiment consommateur (V) constitue l'espace de vie de l'équipage.

5.4 Fibrobacter succinogenes dans MELiSSA

5.4.1 Le compartiment I

Ce compartiment liquéfacteur est la première étape de la boucle MELiSSA et est donc considéré comme une étape clé de la boucle. Ce compartiment est responsable de la biodégradation des matières fécales et des autres déchets générés par l'équipage (parties récalcitrantes du matériel végétal, papier...). La composition en substrat du premier compartiment est normalisée. Les déchets se composent du matériel fécal et de parties non comestibles des plantes (Hermans et Demey, 2001). La matière végétale choisie comme modèle est la paille de blé, la laitue et la betterave. Au cours d'une réunion MELiSSA le 29-30 novembre 2001, il a été décidé de traiter préalablement la matière végétale dans son état normal (humide), pour la betterave et la laitue et de sécher la paille de blé et le papier toilette. Il est cependant important de fournir un matériel d'un diamètre équivalent d'environ 0,5 millimètre pour éviter d'obstruer l'unité de filtration et pour faciliter la biodégradation du matériel par les bactéries anaérobies. Les acides gras volatils et l'ammoniaque produits pendant la fermentation anaérobie de ce substrat sont fournis au compartiment photohétérotrophe (II) colonisé par *Rhodospirillum rubrum*. Le CO₂ est fourni au compartiment photosynthétique d'*Arthrospira platensis* et au compartiment plantes supérieures.

Le compartiment de liquéfaction est donc la première étape de la boucle MELiSSA et détermine la fraction de déchets organiques qui peut être réutilisée dans la boucle. Pendant les 10 dernières années les efforts de recherche ont porté sur le premier compartiment pour maximiser l'efficacité de biodégradation. L'historique de l'évolution du premier compartiment est présenté dans la figure I.25.

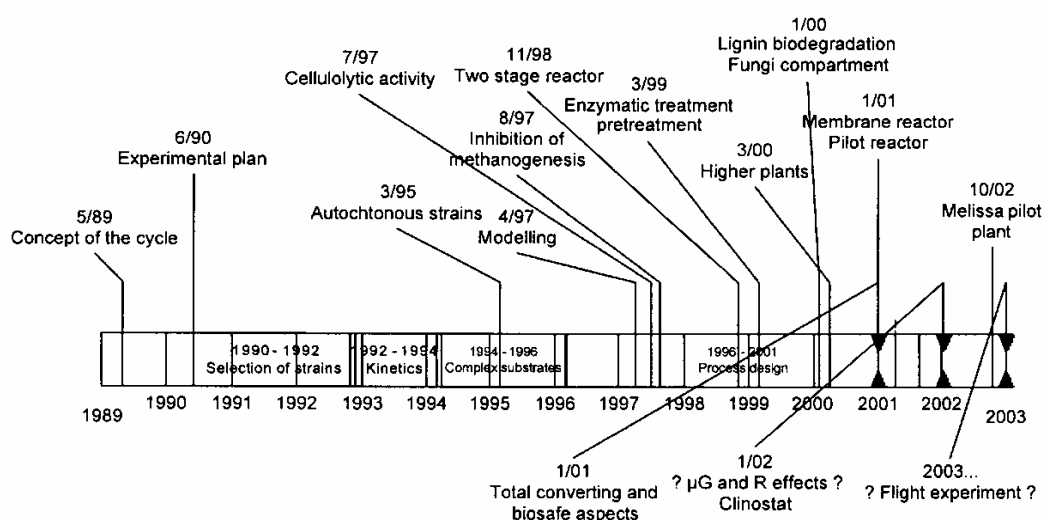


Figure I.25 : Historique du premier compartiment d'après Hermans et Demey, 2000.

Au début du projet, le choix de micro-organismes anaérobies cellulolytiques et protéolytiques a été effectué. Ces micro-organismes ont été isolés à partir des procédés anaérobies tels que la digestion de lisier de porc et le compostage des déchets organiques. Les organismes choisis alors sont *Coprothermobacter proteolyticus*, *Clostridium thermocellum* et *Clostridium thermosaccharolyticum* (Hermans et Demey, 2000). Les cultures axéniques et les co-cultures de ces organismes se sont avérées capables de dégrader un mélange bien défini d'acides aminés, de sucres et de matériel cellulosique avec une production d'acides gras volatils et d'ammoniaque. Cependant ces micro-organismes se sont avérés incapables de dégrader des fèces de rat, de porc et humains d'une manière efficace. Afin de surmonter ce problème, une sélection naturelle d'espèces présentes dans les matières fécales a été cultivée, avec laquelle les protéines sont dégradées à 75 %, les sucres et le matériel fibreux à 55 %. Ainsi, l'inoculum cultivé peut biodégrader le matériel cellulolytique comme la cellulose, le xylane et la pectine avec un rendement élevé. Cependant la lignine semble ne pas être dégradée par l'inoculum choisi. L'idée fut alors de dégrader la lignine dans un compartiment séparé, contenant par exemple des champignons. Plusieurs espèces de mycètes ont été testées : *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus eryngii*, *Lentinus edodes*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, et *Trametes versicolor*. Les divers dosages enzymatiques effectués ont montré que *Pleurotus pulmonarius* P17 possédait la meilleure activité enzymatique vis-à-vis de la lignine, notamment l'activité peroxydase. En effet, *Pleurotus pulmonarius* est capable de se développer sur le substrat MELiSSA et dégrade environ 70 % de la lignine soluble et 50 % de la lignine insoluble en 100 jours (Hermans et Demey, 2000). Par conséquent, *Pleurotus pulmonarius* a été choisi comme ayant l'efficacité la plus grande sur la lignine sachant que cette étape peut être réalisée avant ou après le compartiment I (Doujami et Demey, 2002).

Les efforts les plus récents de recherche ont été focalisés vers la séparation des produits de fermentation au moyen d'une unité de microfiltration. Les conditions optimales de fonctionnement du système tel qu'il est représenté sur la figure I.26 ont été définies de la façon suivante (Doujami et Demey, 2002) :

- le réacteur de liquéfaction doit être à 55°C (conditions thermophiles) et à un pH de 6 pour éviter la production de méthane,
- le réacteur est maintenu en conditions anaérobies,
- l'efficacité de biodégradation du réacteur doit être au moins de 55 % (efficacité maximale obtenue),

- le réacteur doit être équipé de systèmes de gestion des différentes phases en présence : la boucle de gaz pour transférer le CO_2 produit vers le compartiment IVb, la boucle liquide pour transporter les AGV et l'ammonium produits, et la boucle solide afin de dégrader la totalité de la matière organique. Pour la boucle liquide il est très important, pour des raisons de sûreté et pour éviter la contamination des autres compartiments, de maintenir les bactéries dans le bioréacteur par une membrane et une unité de filtration. Le rôle de la membrane est également de séparer les déchets non-dégradés des VFA et de l'ammonium produits.

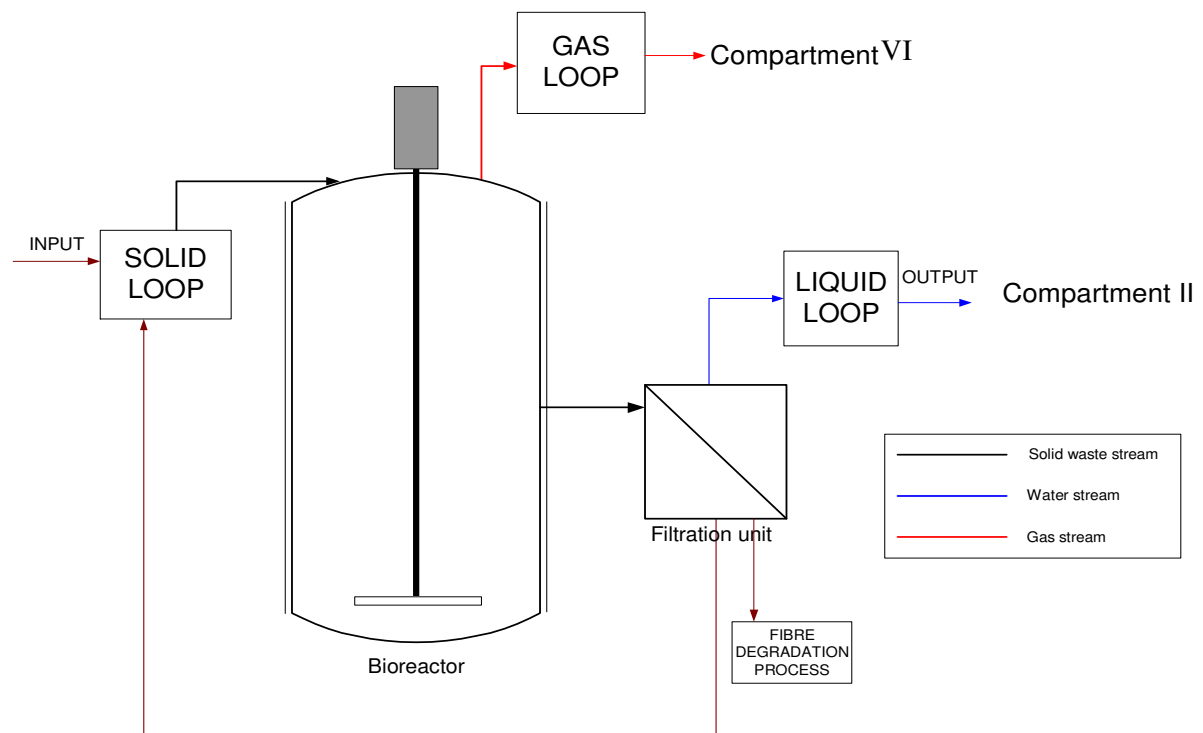


Figure I.26 : Design du premier compartiment d'après Michel et Doulami (2004).

Enfin, l'identification bactérienne du premier compartiment est également effectuée par des techniques récentes de biologie moléculaire (Hendrickx *et al.*, 2003) telles que la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), la RT-PCR et le FISH (Fluorescence In-Situ Hybridisation). Au moyen de ces techniques, le contrôle de l'acidogenèse dans le bioréacteur est possible et les changements bactériens en réponse aux modifications environnementales (température, pH, charge...etc.) peuvent être examinées et identifiées. Enfin par ces techniques, le développement d'organismes pathogènes peut également être décelé et mesuré aux différentes étapes du processus anaérobie.

5.4.2 Le projet MAP

Ces dernières années, les équipes travaillant sur MELiSSA ont porté une attention accrue sur les points critiques du système (Lasseur et Paillé, 2000). Les deux objectifs du premier compartiment sont d'obtenir un maximum de solubilisation/conversion des substances polymériques et une élimination totale des opportunistes et des pathogènes. Bien que les résultats actuels du premier compartiment en terme de rendement de dégradation soient satisfaisants, les objectifs de liquéfaction et de sûreté microbiologique méritent une attention très soutenue car ces deux points sont majeurs pour le bon fonctionnement du premier compartiment et de la boucle en général. En effet, la conversion des matériaux fibreux constitue souvent une des étapes limitantes dans beaucoup de processus biologiques de conversion et la sécurité biologique est vitale puisqu'elle concerne directement la santé des astronautes. En conséquence, le projet MAP a été développé comme une technologie alternative au compartiment I déjà existant. L'activité de ce compartiment alternatif nommé « A total converting and biosafe liquefaction compartment » a commencé en 2001.

La solution proposée dans le projet MAP pour atteindre les objectifs de liquéfaction et de sûreté est une solubilisation multi étapes (Figure I.27) effectuée par trois procédés couplés (deux biologiques et un physique). Le premier utilise des bactéries mésophiles méthanogènes (LabMET, Ghent), le deuxième procédé biologique utilise les capacités enzymatiques (cellulolytiques) de *Fibrobacter succinogenes* (UBP, Clermont Ferrand). Enfin, le procédé physique consiste en une liquéfaction sous haute pression (30 MPa) et à haute température (580-630 K) des parties non dégradées (TUHH, Hambourg).

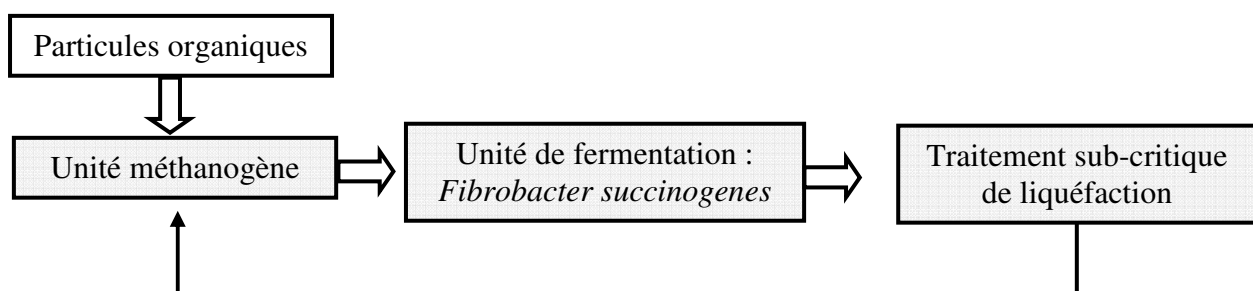


Figure I.27 : Schéma du compartiment alternatif dans le projet MAP

Dans ce projet, il a été décidé d'étudier la dégradation des déchets à partir d'un substrat « modèle » composé de trois déchets végétaux (paille de blé, tourteau de soja et chou), de spiruline et de matières fécales. En effet, la ration alimentaire des cosmonautes sera composée d'un consortium de plantes supérieures (blé, choux, tomate, soja...etc.) et de biomasse issue du compartiment IVa qui devra aussi servir de source de protéines et de vitamines. Ce substrat sera échangé entre les partenaires impliqués dans les différentes étapes du projet après traitement dans chaque unité comme le montre la figure I.27.

5.4.2.1 L'unité méthanogène

La première étape développée à l'université de Ghent, est basée sur un procédé de méthanogenèse. Les biopolymères présents dans les déchets sont convertis par un mélange de micro-organismes (Lissens *et al.*, 2004) en acides gras, CO₂ et méthane. Ceci a pour avantage que les produits finaux de la fermentation, principalement sous forme gazeuse, sont séparés spontanément du milieu liquide de fermentation. Par conséquent, l'inhibition provoquée par les produits de fermentation durant la méthanogenèse est inférieure à celle du compartiment I tel qu'il a été développé jusqu'à présent.

Un réacteur anaérobie (Figure I.28) est utilisé pour convertir un mélange de déchets végétaux et de fèces humains (Lissens *et al.*, 2001). Le substrat est composé d'algues (*Arthrospira platensis*), de tourteaux de soja, de chou, de paille de blé et de fèces. Le fermenteur est maintenu à température constante (34°C), à pH constant (7,3–7,4). Il s'agit d'un bioréacteur de type CSTR dont l'exemplaire développé à l'université de Ghent est de 10 L de volume utile. Il est agité 2 min/h grâce à une plateforme (INNOVA shaker) à une vitesse constante de 90 t/min. Le procédé est alimenté à intervalles de temps réguliers (Fed-batch). Pour chaque volume de substrat ajouté dans le réacteur, un même volume de liquide est retiré simultanément du réacteur.

Les biogaz produits sont mesurés par un piégeage sous cloche et l'effluent gazeux et le volume sont évalués par un dispositif électronique de mesure avec une résolution de 1 ml et une exactitude de 3%. La composition du biogaz a été suivie pendant la fermentation des résidus fibreux. Les résultats obtenus montrent que plus de 85% de la COD (Chemical Oxygen Demand) peut être convertie en biogaz de composition 60-65% en CH₄ et 35-40% en CO₂. L'efficacité de biodégradation du digesteur atteint 2,6 g COD/L/j, c'est-à-dire 1,6 g

DM/L/j, menant à une production de biogaz de 1,6 L/L/j pendant 3-4 mois (Lissens et Windey, 2004). Ceci permet d'obtenir la quantité nécessaire de résidu fibreux (environ 200 g MS) pour alimenter l'unité de fermentation cultivant *Fibrobacter succinogenes*. Les performances de ce réacteur sont stables au taux d'alimentation de 0,5 L/jour.

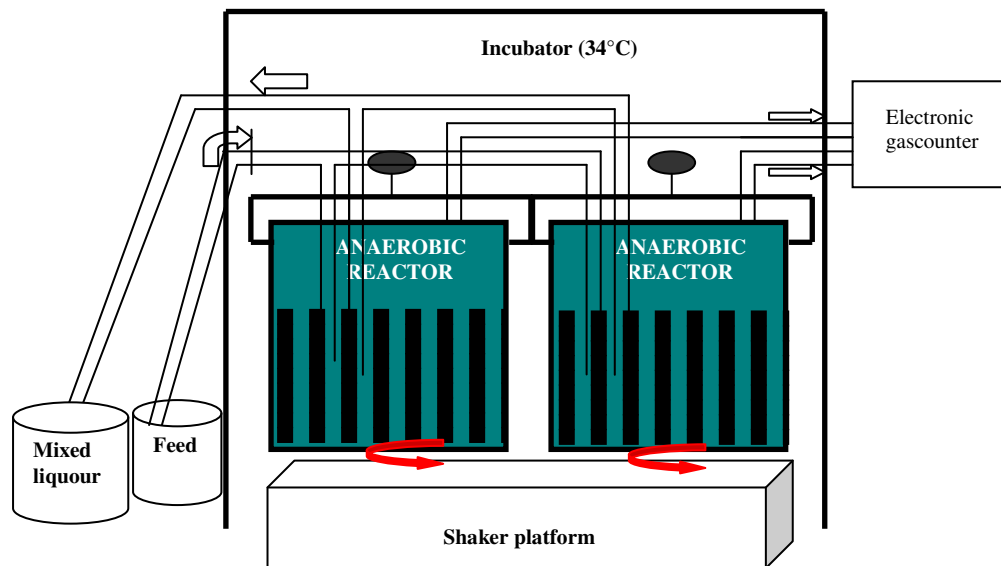


Figure I.28 : Design du réacteur de méthanogénèse d'après Lissens et Windey (2004).

5.4.2.2 L'unité utilisant *Fibrobacter succinogenes*

Pour la deuxième étape, *Fibrobacter succinogenes* a été sélectionné pour ses capacités à dégrader les végétaux, et particulièrement pour son équipement enzymatique (Cf. § 4.4) très efficace vis à vis de la cellulose (Chesson et Forsberg, 1997). C'est le développement de cette étape qui est au cœur de ce travail.

Pour cultiver *F.s.*, un fermenteur a été conçu avec les contraintes de le maintenir en anaérobie stricte (Séon *et al.*, 2003), l'objectif étant de collecter un maximum d'informations sur la dégradation du mélange des déchets végétaux par cette bactérie. Un réacteur agité de 5 L est équipé de sondes afin de suivre le pH, le potentiel d'oxydoréduction, la pression interne (garant des conditions d'anaérobie) et la température ; tous les signaux générés sont reliés à une unité de commande. Les détails de l'installation et de son fonctionnement sont donnés dans le chapitre « Matériels et Méthodes ». Les résidus de cette unité de fermentation

permettent d'alimenter l'unité suivante qui est l'unité de dégradation par procédé supercritique.

5.4.2.3 L'unité supercritique

La dernière étape concerne l'utilisation du CO_2 dans la liquéfaction sub- et supercritique afin d'augmenter l'efficacité de liquéfaction des fibres récalcitrantes. En outre, une nouvelle technique supercritique oxydante de liquéfaction utilisant du peroxyde d'hydrogène a été explorée pour décomposer complètement la fraction la plus inerte des solides telle que la lignine. Les procédés qui fonctionnent dans des conditions proches du point critique de l'eau (22,1 MPa, 647 K) fournissent des résultats prometteurs de solubilisation et de réaction pour une grande variété d'applications (Albrecht et Brunner, 2004). En effet, dans la région proche du point critique, les propriétés de l'eau permettent de solubiliser les fibres efficacement. La figure I.29 montre le procédé expérimental utilisé. Pendant la première phase de projet, des expériences ont été principalement entreprises aux états proches du point critique afin d'améliorer la destruction des substances persistantes par oxydation supercritique grâce à un four à haute température. Celui-ci permet d'obtenir des températures de fonctionnement jusqu'à 500°C , ce qui est bien au-dessus de la température critique de l'eau (374°C).

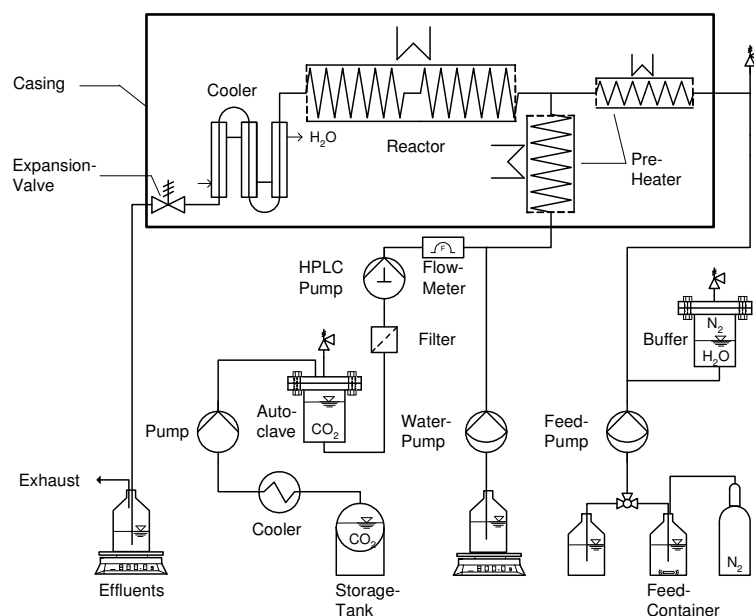


Figure I.29 : Design du réacteur sub-critique de liquéfaction d'après Albrecht et Brunner (2004).

Les résultats obtenus durant l'échange de substrats entre partenaires montrent des rendements de dégradation de 35-40 % en condition non oxydative (Albrecht et Brunner, 2004). Par contre en condition d'oxydation, des rendements de liquéfaction proches de 100% sont atteints. En effet, très peu de résidus sont retrouvés en fin de processus.

5.4.2.4 Décomposition hyperthermophile

Enfin un dernier procédé de dégradation des végétaux a été essayé (TUHH, Hambourg) fonctionnant en parallèle, de façon autonome (pas d'échange de substrat avec les autres « partenaires ») et utilisant des organismes hyperthermophiles. L'objectif de ce compartiment est de transformer les déchets solides et liquides en CO₂, AGV et ammoniac. Ces produits seront récupérés par les autres compartiments pour y être transformés en biomasse consommable par les cosmonautes et/ou assimilable par les végétaux.

L'unité hyperthermophile utilise des organismes hyperthermophiles qui possèdent une grande efficacité d'hydrolyse des composés organiques (Huber et Stetter, 1998). Les organismes hyperthermophiles comme *Pyrococcus furiosus* peuvent se développer à des températures de 100°C avec des taux de croissance élevés (Fiala *et al.*, 1986 ; Krahe *et al.*, 1996). L'objectif de ce procédé est donc de mettre au point un procédé de liquéfaction afin de simplifier la dégradation. De plus ce procédé comporte d'autres avantages tels que la réduction des coûts, la diminution de la viscosité ce qui améliore le mélange du milieu, l'extraction de produits tel que l'éthanol par le vide, la réduction de la contamination par d'autres micro-organismes, ce qui permet un fonctionnement stable sur de longues périodes, et enfin, une diminution de la solubilité de l'oxygène (garantir l'anaérobie). Un réacteur de 6L équipé d'une membrane de dialyse a été utilisé (Figure I.30).

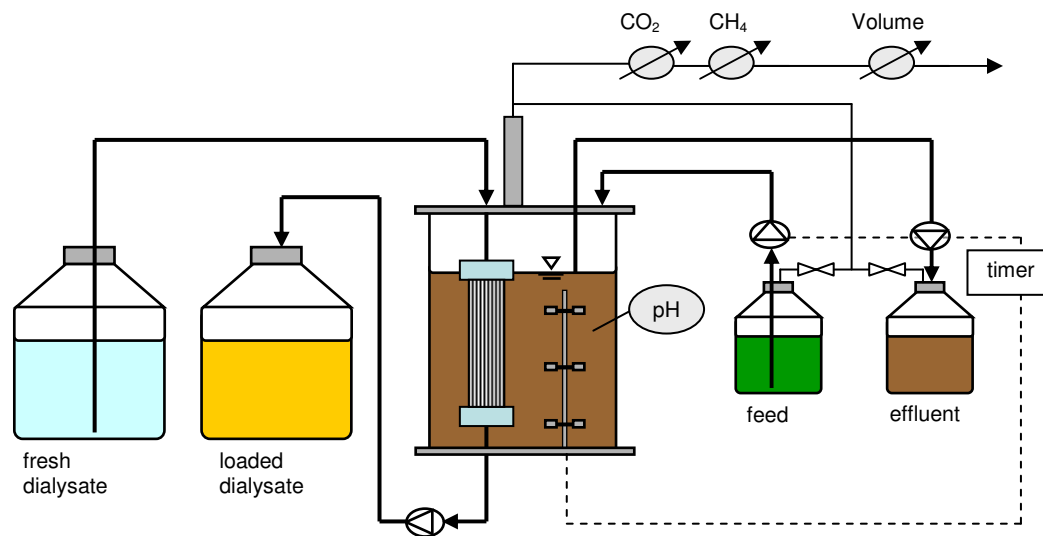


Figure I.30 : Design du réacteur à dialyse d'après Kube (2004).

L'efficacité de ce procédé sur des substrats végétaux n'a pas été prouvée complètement. Il n'est plus à l'étude aujourd'hui.

5.5 Conclusion

➤ Le concept MELiSSA

Pour mettre en place l'écosystème MELiSSA, il est donc nécessaire d'avoir un compartiment de dégradation des déchets performant. Cette dégradation est actuellement réalisée par le premier compartiment grâce à un consortium de bactéries permettant la production d'AGV, d'ammoniaque et de CO₂ nécessaires aux compartiments suivant (II et IV) et permettant une efficacité de dégradation maximum des déchets de 55%.

➤ *Fibrobacter succinogenes* dans MELiSSA

Pour des soucis de liquéfaction optimale et de sûreté microbiologique, un compartiment alternatif a été développé. Ce nouveau compartiment se compose de trois unités permettant une dégradation efficace des fibres et la neutralisation des agents pathogènes. La première unité est une biométhanogenèse permettant une réduction de 85% de la COD mais produisant aussi du méthane dont le recyclage devra être assuré par le système MELiSSA. Les résidus de cette unité alimentent la seconde et sont fermentés par *Fibrobacter succinogenes* afin de compléter la dégradation des fibres. Enfin, la dernière unité dégrade les résidus de l'unité de fermentation par un procédé permettant des gradients élevés de température et de pression. L'efficacité totale de ce compartiment est proche de 100% si on le fait fonctionner dans des conditions oxydatives.

Dans les chapitres suivants, les matériels et les méthodes utilisés seront développés, ainsi que les résultats de fermentations sur glucose dans un premier temps puis les résultats de dégradations de végétaux modèle (chou, paille et soja) sans traitement préalable. Ensuite nous exposerons les résultats de dégradation du substrat de la « boucle » MAP préalablement dégradé par l'unité de méthanogenèse. Enfin, des recherches de contamination dans nos cultures seront effectuées.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

1 INTRODUCTION

L'objectif pratique de cette étude est très pragmatique et répond à des exigences contractuelles précises dans le cadre du projet Microgravity Application Programme (projet MAP) financé par l'ESA : (i) dégrader des résidus organiques d'origine végétale préalablement issus d'un procédé de méthanisation anaérobie ; (ii) délivrer la partie solide restante (fraction récalcitrante) après l'action de *Fibrobacter succinogenes* à l'équipe chargée du traitement ultime des résidus solides par un procédé supercritique.

Néanmoins, les techniques de suivi, de compréhension et d'analyse que nous avons mises en place ainsi que le plan expérimental que nous avons suivi s'inscrivent dans une démarche rationnelle de compréhension de la culture de *F.s.* et dépassent donc largement l'objectif pratique. De façon classique en génie des procédés, cette approche comporte structurellement des capacités explicatives et de compréhension qui peuvent toujours être exploitées dans un cadre plus large.

Par ailleurs, notre préoccupation a été d'essayer de quantifier les rendements et les vitesses et de modéliser l'ensemble. Ceci alourdit considérablement les protocoles expérimentaux mais fournit à l'étude des bases quantitatives, sachant que, dans le domaine de la digestion anaérobie, ce type d'approche est peu courant.

Les matériels et les méthodes que nous avons mis en place tentent de répondre à ces exigences et s'apparentent donc plus à la démarche classique pratiquée pour les cultures pures en bioréacteurs qu'aux pratiques usuelles développées pour tester la biodégradabilité de déchets complexes. Ceci est pleinement justifié d'ailleurs par l'objectif final d'insertion de ces dispositifs de traitement dans un écosystème clos spatialisable où les contraintes de bilans matière, de maîtrise, de contrôle et de compréhension du procédé deviennent prépondérantes.

2 CONDITIONS DE CULTURE

2.1 Description de la souche

La souche S85 (ATCC19169) de *Fibrobacter succinogenes*, isolée à partir du rumen de bovin par Bryant et Doest (1954) a été utilisée. Cet organisme croît sur un milieu synthétique comprenant du jus de rumen à 39°C en anaérobiose stricte et à un pH de 5,5 à 6.

2.2 Définition des milieux de culture

La souche de *Fibrobacter succinogenes* utilisée dans ce travail a été cultivée en anaérobiose stricte sous atmosphère de CO₂, à 39°C, sur deux milieux. Ces deux milieux se composent de trois solutions minérales (I, II et III) et d'une solution d'acides gras volatils (AGV) identiques. Le premier milieu contient en plus 40% de jus de rumen (Halliwell et Bryant, 1963). Il est utilisé pour les besoins de repiquage de la souche. Le second ne contient pas de jus de rumen et est appelé milieu synthétique (Gaudet *et al.*, 1992). Il est utilisé pour les cultures en bioréacteur.

➤ Composition des solutions communes

	Solutions	Composition	Quantité	Fournisseur, pureté, n° de lot
Solutions minérales	I :	K ₂ HPO ₄	0,6%	Riedel-deHaën, 99%, 12070
	II :	KH ₂ PO ₄	0,6%	Fluka, 99%, 443230/1
		(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2%	Acros, 99,5%, A0211310001
		NaCl	1,2%	Prolabo, 99%, M094/02144
		MgSO ₄	0,12%	Acros, 97%, A019186701
		CaCl ₂	0,12%	Aldrich, 98%, 15577-077
	III :	MnSO ₄ , 6H ₂ O	0,015%	Merck, 99%, 136806
		CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,0015%	Aldrich, 98%, JN03203KG
		FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,040%	Acros, 99,5%, A015538701
	Solution d'AGV :	A. acétique	54,8%	Acros, 99%, A019579901
		A. propionique	19,4%	Merck, 99%, 5217877
		A. butyrique	12,9%	Merck, 99%, 720949
		A. isobutyrique	3,2%	Acros, 99,5%, A018255701
		A. n-valérique	3,2%	Aldrich, 99%, 13306-076
		A. isovalérique	3,2%	Aldrich, 99%, 56714-017
		A. DL 2 méthylbutyrique	3,2%	Aldrich, 98%, 4053340

Les solutions minérales sont conservées à 4°C et la solution d'AGV est conservée à l'abri de la lumière sous une hotte chimique.

➤ Milieu contenant 40% de jus de rumen

Ce milieu est utilisé pour la mise en culture et la propagation de la souche en tube de Hungate.

		Fournisseur, pureté, n° de lot
Solution minérale I	7,5%	
Solution minérale II	7,5%	
Solution minérale III	0,02%	
Solution d'AGV	0,3%	
Biotine	0,02%	Acros, 98%, A013233101
PABA	0,01%	Acros, 99%, A019664101
Hemin	0,1%	Fluka, 98%, 1206798
Résazurine	0,1%	Riedel-deHaën, 98%, 513473-452
Substrat : cellobiose	8 g/L	Fluka, 99%, 457020/1
H ₂ O	44%	
Jus de rumen	40%	Fournit par l'INRA de Theix
Na ₂ CO ₃	0,4%	Fluka, 99%, 52210
Cystéine, HCl	0,05%	Acros, 98%, 016K0372

Les milieux sont portés à 100°C. Le Na₂CO₃ et la cystéine sont ajoutés lentement, sous flux de CO₂. La cystéine permet d'abaisser le potentiel d'oxydoréduction à une valeur proche de -350 mV. Après la réduction, (la résazurine rose en milieu oxydé devient incolore en milieu réduit), le milieu est réparti dans des tubes de Hungate (9 mL), sous flux de CO₂. Les milieux sont ensuite autoclavés 20 min à 121°C et sont conservés à 4°C.

➤ Milieu synthétique

Solution minérale I	7,5%
Solution minérale II	7,5%
Solution minérale III	0,02%
Solution d'AGV	0,3%
Biotine	0,02%
PABA	0,01%
Hemin	0,07%
Résazurine	0,1%
Substrat	Variable selon la culture
H ₂ O	84%
Na ₂ CO ₃	0,4%
Cystéine, HCl	0,05%

Ce milieu est utilisé pour effectuer les cultures en fiole Erlenmeyer et en réacteur.

Le milieu est autoclavé (sans le Na₂CO₃ et la cystéine) 20 min à 121°C. Après l'autoclavage, le Na₂CO₃ et la cystéine sont ajoutés lentement, sous flux de CO₂. Après réduction en

conditions stériles, le milieu estensemencé à 1,6% en fiole Erlenmeyer avec des cultures en tube de Hungate et à 15% en réacteur avec des cultures en Erlenmeyer.

2.3 Source de carbone

2.3.1 En Erlenmeyer

Les cultures en fiole Erlenmeyer ont été effectuées pour la réalisation de précultures pour inoculer le bioréacteur. La source de carbone utilisée est le cellobiose à 8 g.L⁻¹.

2.3.2 En bioréacteur ou en réacteur RUSITEC

La source de carbone est, soit le glucose (Acros, 99%, A0236939), soit les végétaux, soit le substrat MAP.

➤ Sur glucose

Lors de cultures en batch, le glucose est incorporé au milieu de culture avant autoclavage. Lors de culture en fed-batch, le premier ajout de glucose est ajouté au milieu de culture avant autoclavage. Pour les ajouts séquentiels en cours de culture, le glucose est introduit sous forme dissoute dans 100 mL de la solution minérale II autoclavée afin d'apporter également une source d'azote. La concentration finale après ajout de glucose est variable selon les expériences (de 8 à 10 g.L⁻¹).

➤ Sur végétaux

Seules des cultures en fed-batch ont été effectuées sur végétaux. Le substrat végétal est constitué de chou, de paille de blé et de tourteaux de soja. Deux types de cultures ont été effectués sur végétaux : séparément ou en mélange.

Le premier ajout est incorporé au milieu de culture avant autoclavage du bioréacteur, puis les végétaux sont ajoutés autoclavés de façon régulière dans le bioréacteur. Lors des cultures sur les végétaux pris séparément, la concentration finale est de 10 g de matière sèche.L⁻¹. Lors des cultures sur le mélange de végétaux, 1/3 de chaque végétal est ajouté afin d'obtenir une

concentration finale de environ 10 g de matière sèche.L⁻¹. Le substrat végétal est alors composé de 3,32 g de matière sèche/L de paille de blé finement broyée, de 3,32 g de matière sèche.L⁻¹ de tourteaux de soja finement broyée et de 3,32 g de matière sèche/L de choux.

➤ Sur le substrat MAP

Le substrat est fourni par le laboratoire LabMET (UGent, Belgique). Il résulte d'une première étape de dégradation anaérobie par un procédé de méthanisation. Des cultures en batch et en fed-batch ont été effectuées. Lors de cultures sur le substrat MAP en fed-batch, la première dose de substrat est ajoutée au milieu de culture avant autoclavage ; puis le substrat est ajouté autoclavé une fois par semaine. La concentration finale en substrat après chaque ajout est de 8,3 g.L⁻¹. Pour les cultures en batch la concentration finale en substrat est de 50 g.L⁻¹. Pour toutes les cultures (en batch ou en fed-batch), 200 gMS de substrat ont été ajoutés au total.

3 MISE EN CULTURE DE LA SOUCHE

3.1 En fiole Erlenmeyer

600mL de milieu synthétique sont préparés en fioles Erlenmeyer (1 L). Ces fioles sont ensuiteensemencées à partir de cultures en tubes de Hungate (10 mL) puis incubées 12h à 39°C.

3.2 En bioréacteur

Les cultures réalisées sont de type discontinu. Elles sont réalisées dans un bioréacteur de type cuve agitée Setric d'un volume utile de 4 litres (pour un volume total de 5 litres). Tout le matériel de culture est stérilisé par autoclavage 20 min à 121°C. Le bioréacteur estensemencé par un inoculum (15%) provenant d'un Erlenmeyer.

3.2.1 Le bioréacteur

3.2.1.1 Description du bioréacteur

Le bioréacteur utilisé se compose (Figures II.1 et II.2) :

- D'une platine supérieure en acier inoxydable autoclavable comprenant des orifices pour placer :
 - une électrode à pH et une électrode redox de 225 mm stérilisables en place (Mettler Toledo, Suisse, Pt4805), étalonnées avant chaque stérilisation du réacteur,
 - une sonde température (Pt100),
 - un capteur de pression absolue (JPB Tb808A),
 - une canne de prélèvement,
 - une canne d'injection pour la régulation du pH,
 - un système d'agitation,
 - un échangeur de chaleur pour la régulation de la température,
 - une entrée pour le CO₂,
 - une sortie pour l'effluent gazeux équipée d'une électrovanne qui expulse le gaz produit lorsque la pression interne est de 1,5 bars et la ramène à 1,15 bars, ce qui permet de connaître la quantité de gaz produit au cours de la culture.
- D'une cuve en verre normalisée stérilisable à l'autoclave.

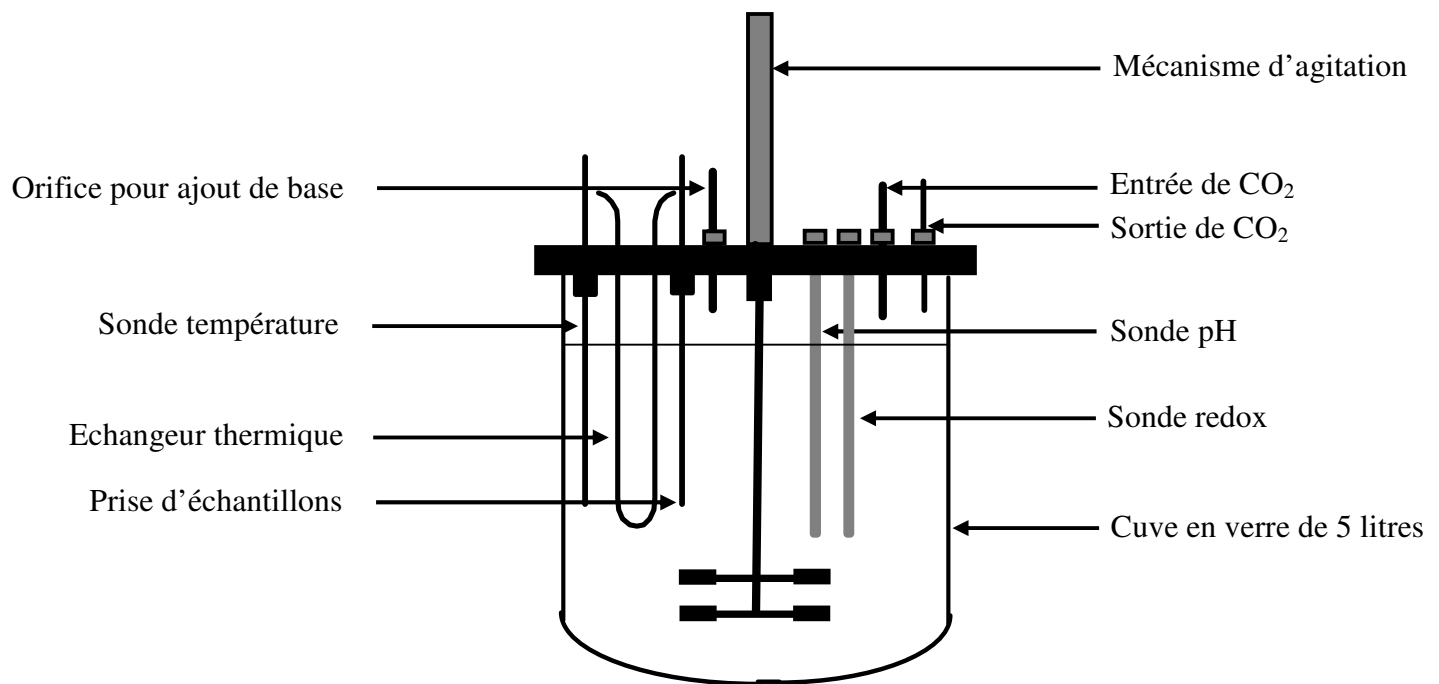


Figure II.1 : Schéma détaillé du bioréacteur



Figure II.2 : Photographie du bioréacteur

3.2.1.2 Système de commande et de régulation

L'objectif du contrôle du procédé est de créer un environnement favorable pour la culture afin d'assurer une productivité maximale.

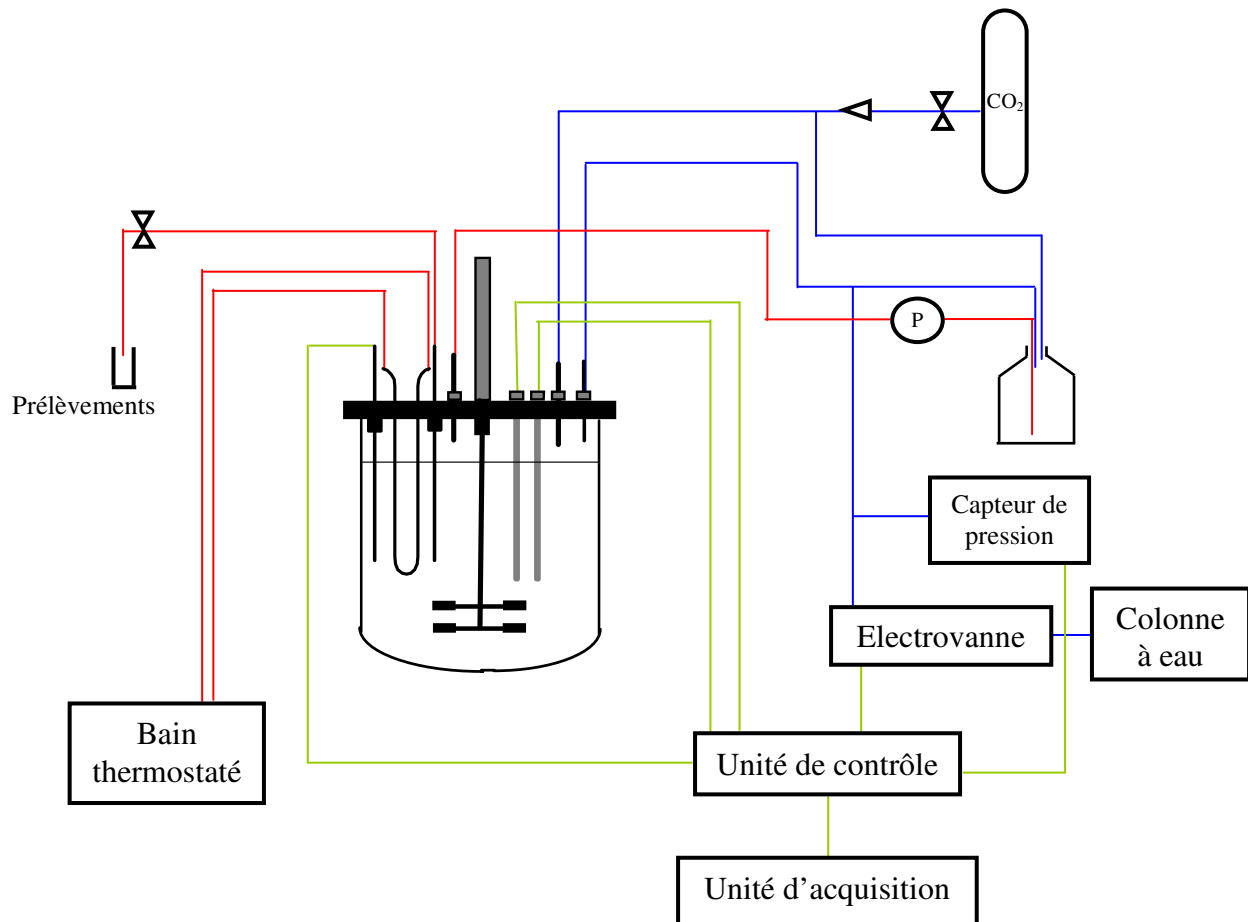


Figure II.3 : Schéma représentatif du réacteur avec les systèmes de contrôle

P : Pompe péristaltique, — : Connexions électriques, — : Connexions gaz, — : Connexions liquides.

Les paramètres environnementaux qui définissent les conditions de culture (pH, température, pression, agitation) constituent les principaux paramètres de contrôle (Figure II.3).

- **Système de régulation de la température :** le système de régulation de température dans le réacteur est constitué d'un échangeur de chaleur inox plongé dans le milieu de culture dans lequel circule de l'eau provenant d'un bain thermostaté (Julabo, F12) à 39°C.

- Régulation du pH : le pH est régulé à 6,01 au cours de la culture par ajout d'une solution de Na_2CO_3 (100 g.L^{-1}) à l'aide d'une pompe péristaltique (Gilson, millipuls 2).
- L'agitation : elle se fait au moyen d'une turbine à 8 pales. Le moteur est commandé par un variateur de vitesse électronique permettant une régulation de la vitesse d'agitation à 100 rpm.
- Contrôle de la pression : la sortie de CO_2 est reliée à un capteur de pression et à une électrovanne qui s'ouvre lorsque la pression interne est de 1,5 bars (pression absolue) pour la ramener à 1,15 bars, le temps d'ouverture de cette électrovanne est compris entre 0,5 s et 2,5 s. Cette électrovanne est reliée par un tuyau souple à une colonne d'eau qui permet de mesurer le volume de gaz expulsé au moment de l'ouverture.

L'ensemble des données est recueilli par un logiciel Biowatch (version 2.26). L'acquisition se fait paramètre par paramètre. Pour chaque paramètre, une valeur est enregistrée toutes les 4 minutes. Cette valeur correspond à la moyenne des valeurs enregistrées pendant 1 minute (1 point toutes les 10 s).

3.2.1.3 Calcul de la quantité de biogaz produite

A chaque ouverture de l'électrovanne qui maintient la pression dans le réacteur à une valeur inférieure à 1,5 bars, le gaz est libéré dans une cloche retournée sur une cuve remplie d'eau (Figure II.4).

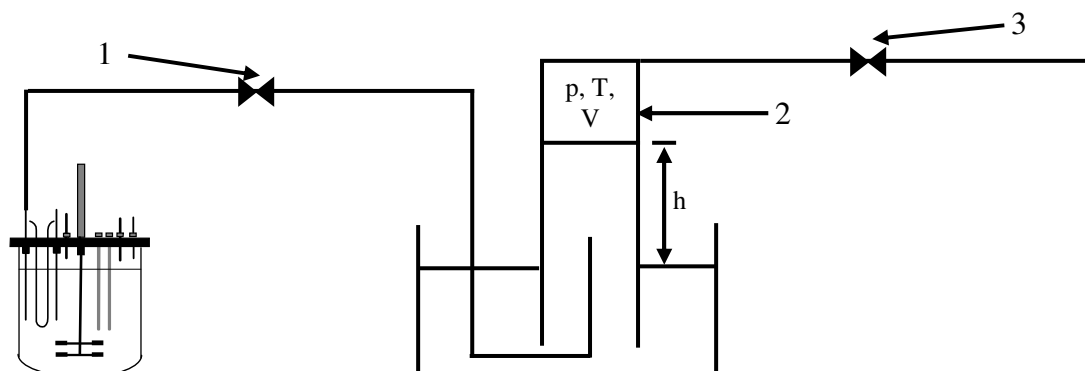


Figure II.4 : Schéma représentatif du système de récupération des gaz.

1 : électrovanne, 2 : cloche de récupération (éprouvette graduée), 3 : vanne de remise à l'atmosphère.

A chaque ouverture de l'électrovanne un volume pratiquement constant et égal à 700 mL ($\pm 3\%$) est libéré.

Ce volume est mesuré dans les conditions de température et de pression de la cloche soit :

$$T = 20^{\circ}\text{C} = 293 \text{ K};$$

$$p = p_{\text{atm}} - \rho gh$$

où p_{atm} désigne la pression atmosphérique dans le laboratoire et h est la hauteur d'eau restant dans la cloche (qui est une éprouvette graduée).

Avec une pression moyenne à Clermont Ferrand de 730 mm Hg et pour une hauteur $h = 26$ cm, p vaut en moyenne 94750 Pa.

Ceci conduit à un volume molaire pour un gaz parfait de $25,77 \text{ L.mole}^{-1}$.

Considérant que le gaz produit est essentiellement du CO_2 et que son coefficient de compressibilité dans les conditions T et p vaut $Z = 0,996$, les calculs précédents conduisent à une concentration massique dans le gaz piégé dans la cloche de $1,72 \text{ gCO}_2.\text{L}^{-1}$.

Puisque 700 mL de gaz sont expulsés à chaque ouverture de l'électrovanne, 1,20 g de CO_2 sont donc libérés. Ce résultat a une précision moyenne de $\pm 3\%$. Nous prendrons en compte cette valeur pour effectuer les bilans carbone sur le réacteur. En pratique il sera suffisant de compter le nombre d'ouvertures de la vanne pour connaître la quantité de CO_2 formée. La mesure de la fréquence d'ouverture donne donc le débit de CO_2 produit.

3.2.2 Préparation du bioréacteur

Deux milieux synthétiques sont préparés, l'un (600 mL) en flacon Erlenmeyer (1 L) et l'autre (3,4 L) dans le réacteur (5 L). Le premier est inoculé avec 10 mL de culture de *Fibrobacter succinogenes* sur le milieu contenant du jus de rumen et incubé 24 h à 39°C . Ces 600 mL seront utilisés comme préculture pour le bioréacteur. Le deuxième après autoclavage et ajout de la cystéine et de Na_2CO_3 est placé sous flux de CO_2 , sous agitation (90–100 rpm) et à une température de 39°C pendant 12 h.

A $t=0$, le réacteur est inoculé avec les 600 mL de la préculture et un échantillon de 5 mL est prélevé pour l'analyse de la phase liquide à t_0 . Le réacteur est alors fermé hermétiquement et mis manuellement sous pression de CO_2 (1,2 bars). Lors de cultures en fed-batch, l'ajout de substrat en cours de culture est effectué à pression atmosphérique, sous flux de CO_2 et le

bioréacteur est remis à une pression de 1,2 bars à sa fermeture. Les prélèvements sont effectués par la canne de prélèvement sous l'effet de la pression interne du réacteur.

3.3 En réacteur RUSITEC (RUmen SIMulation TECHnique)

3.3.1 Le réacteur

Le réacteur RUSITEC dispose de quatre unités identiques de culture (Figures II.5 et II.6). Chaque unité ou réacteur est relié à un système d'évacuation des effluents. Le gaz produit est envoyé dans une colonne graduée, permettant la mesure du volume produit. Les quatre réacteurs sont plongés dans un bain-marie dont la température est ajustable à l'aide d'un système de régulation de chauffage.

Chaque unité est composée d'un cylindre en P.V.C. d'une contenance de 1 L. Ce cylindre contient une nacelle (Figure II.7) dans laquelle se trouve le substrat enfermé dans un sachet en nylon de porosité de 100 μm . Cette porosité permet aux bactéries de pénétrer dans le sac de nylon afin de dégrader le substrat mais ne permet pas à celui-ci d'en sortir. L'agitation de la nacelle se fait par un mouvement de va et vient vertical.

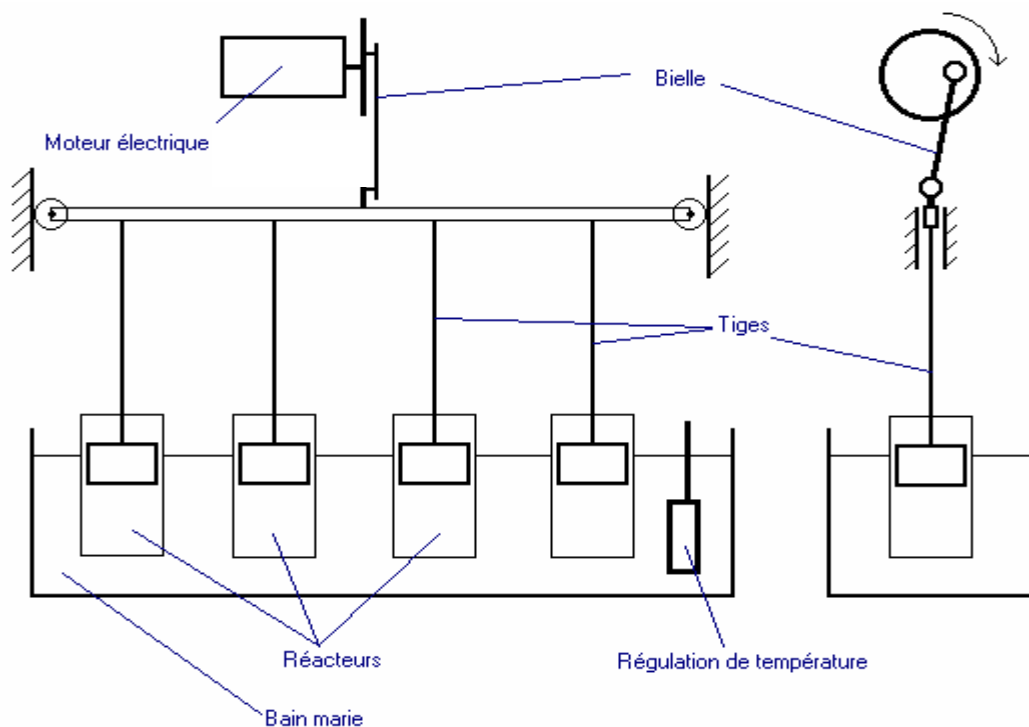


Figure II.5 : Schéma du RUSITEC.

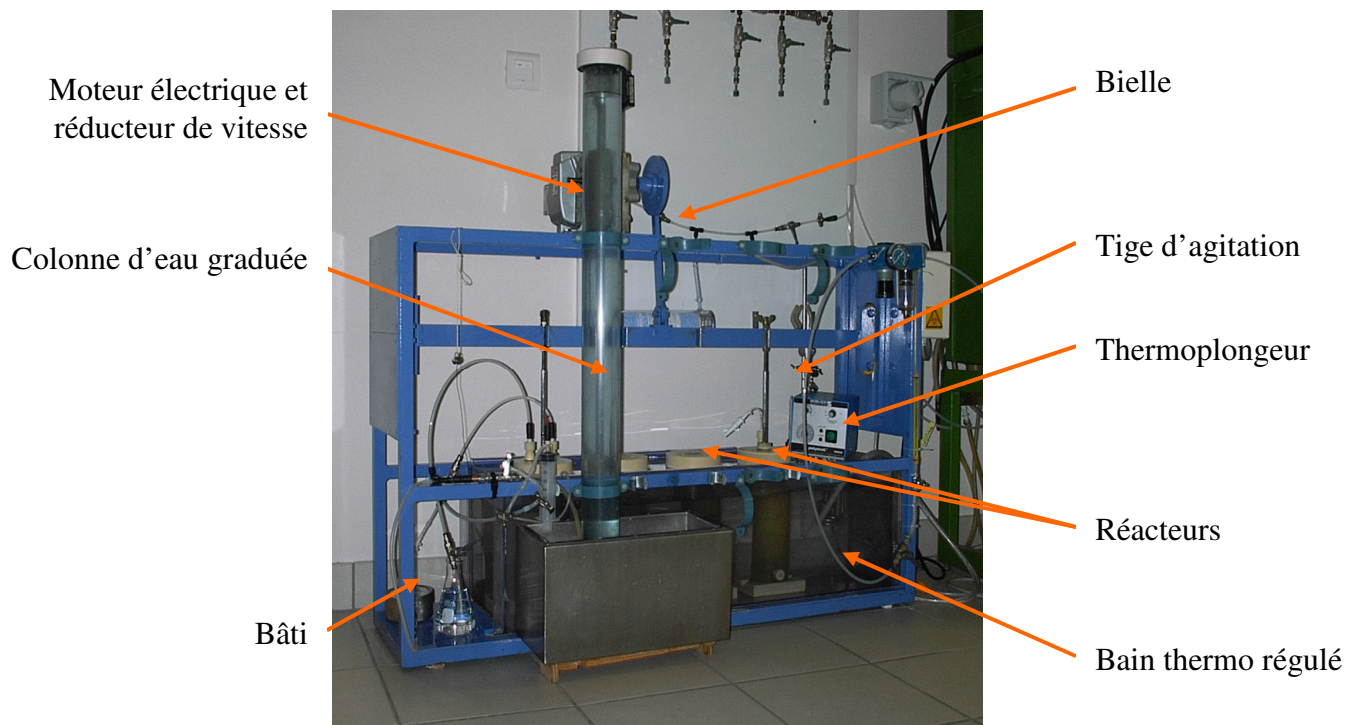


Figure II.6 : Photographie du RUSITEC.

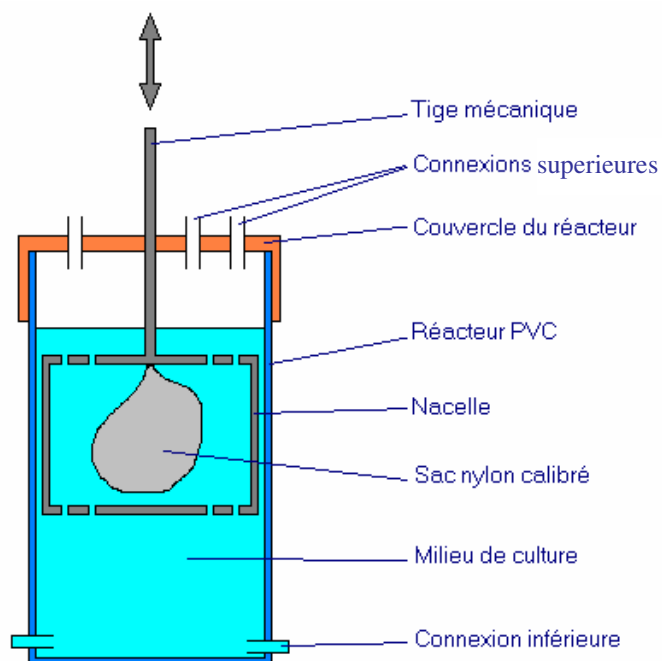


Figure II.7 : Schéma d'une unité de fermentation.

Sur le couvercle du réacteur, trois connexions sont possibles (Figure II.7) : la première permet de connecter le réacteur à l'arrivée de CO₂ afin de maintenir l'anaérobiose, la deuxième est reliée à un manomètre pour connaître la pression dans le réacteur et à une cloche d'eau afin de mesurer la quantité de gaz produit. La dernière connexion permet d'effectuer des prélèvements au cours de la culture. Dans le fond du réacteur, deux autres connexions sont possibles.

L'objectif du procédé RUSITEC est de créer un environnement similaire à celui retrouvé dans le rumen et donc favorable à la croissance de *Fibrobacter succinogenes*. La pression, la température, le système d'inoculation et le système de prélèvement constituent les principaux paramètres de contrôle.

- Le circuit de gaz : il s'agit d'un circuit simple constitué d'une arrivée de CO₂, d'une sortie des gaz produits vers une colonne d'eau graduée. Cette sortie comporte une soupape permettant de garder une surpression de 1,52 bars dans le réacteur. La configuration du circuit est détaillée dans l'annexe 1.
- Système de régulation de la température : chaque unité de fermentation est plongée dans un bain d'eau chauffé grâce à une résistance chauffante (39°C). Pour éviter l'évaporation importante et limiter les pertes thermiques, un couvercle en P.V.C. est placé sur le bain contenant les quatre réacteurs.
- Le système d'inoculation : afin de maintenir la stérilité et l'anaérobiose, un Erlenmeyer est utilisé pour effectuer la préculture qui servira à inoculer le réacteur. L'Erlenmeyer utilisé possède un double piquage et est hermétiquement fermé et autoclavé. Le piquage supérieur est connecté à l'atmosphère du réacteur. Le piquage inférieur est relié au milieu dans le réacteur. Après équilibre des pressions, le contenu de l'Erlenmeyer s'écoule par gravité. Le protocole d'inoculation contenant les différentes connexions se trouve en annexe 2.
- Le système de prélèvement : les prélèvements sont réalisés grâce à une seringue via un tuyau souple en connexion avec le contenu du réacteur. Cette seringue est également reliée au circuit de gaz afin de maintenir l'anaérobiose. Le protocole de prélèvement est décrit en détail en annexe 3. Cette connexion au circuit gaz est essentielle et permet :
 - de purger le tuyau de prélèvement et la seringue avec du CO₂ ce qui garantit le maintien de l'anaérobiose,

- de refouler le contenu du tuyau dans le réacteur après prélèvement ce qui évite d'avoir du liquide stagnant dans le tuyau de prélèvement.

3.3.2 Préparation du réacteur

3.3.2.1 Stérilisation

Les unités de fermentation sont en P.V.C.. La stérilisation à haute température par autoclavage est impossible. Une méthode chimique de stérilisation a donc été choisie afin d'éliminer les résidus et micro-organismes des cultures précédentes. Le protocole de désinfection utilisé est de type acide base. La méthode est basée sur les procédures de nettoyage en place (NEP) utilisées dans les industries agroalimentaires.

Toute la désinfection est effectuée sous une hotte à flux laminaire. Le réacteur est, dans un premier temps, brossé et rincé à l'eau stérile. Le brossage s'effectue à l'aide d'un écouvillon stérilisé dans une solution d'eau de javel à 60°chl puis rincé à l'eau stérile. Ensuite le réacteur est brossé avec une solution de NaOH à 1% puis avec une solution de HNO₃ à 0,5%. Enfin le réacteur est rincé à l'eau stérile afin d'éliminer les traces des produits précédents.

3.3.2.2 Culture

600 mL de milieu synthétique sont préparés dans un Erlenmeyer. Le sac de nylon contenant le substrat est placé dans cet Erlenmeyer. Après la stérilisation par autoclavage et la réduction du milieu, celui-ci est introduit dans le réacteur (stérilisé) sous la hotte à flux laminaire. Le réacteur une fois fermé est placé dans le RUSITEC et balayé, pendant 12 h, par un flux de CO₂.

Parallèlement 100 mL de milieu synthétique sont préparés dans un Erlenmeyer à double piquage afin d'effectuer la préculture. Après la stérilisation par autoclavage et la réduction du milieu, il est inoculé et incubé pendant 12 h à 39°C. Le réacteur est inoculé avec la préculture sous flux de CO₂ ; l'agitation est mise en fonctionnement et la pression est fixée à 1,4 bars.

4 TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE LA PHASE LIQUIDE

Lors du suivi des cultures, des prélèvements de la phase liquide sont régulièrement effectués. Les mesures spectrophotométriques ont été réalisées grâce à un spectrophotomètre SAFAS UV mc (Safas, Monaco).

4.1 Poids secs

Les poids secs sur la phase liquide sont réalisés sur les cultures sur glucose uniquement. Ils sont réalisés en filtrant 10 mL de milieu sur filtres pré-pesés de porosité 0,45 μm . Ces filtres sont ensuite mis à l'étuve à 105°C jusqu'à ce que leur poids se stabilise (environ 24 h). Ces mesures de poids secs comparés aux mesures spectrophotométriques permettent d'établir une corrélation $\text{DO}_{600\text{nm}}$ /poids secs utilisable pour suivre la croissance au cours des cultures sur glucose.

Pour les cultures sur végétaux, le suivi de la croissance ne peut pas être réalisé simplement par une mesure de l'absorbance du fait de la présence des végétaux. Cette croissance est donc observée par la quantité de gaz expulsée à chaque ouverture de l'électrovanne, la quantité d'AGV produits dosée à chaque prélèvement et la mesure de la dégradation des végétaux déterminée en fin de culture.

4.2 Dosage des métabolites

La mesure des produits formés au cours de la dégradation (AGV) est réalisée par HPLC (chromatographie liquide haute performance) sur un échantillon de 5 mL. Ces échantillons sont déprotéinisés afin de ne pas obstruer les colonnes de l'HPLC. Pour cela 2 mL d'échantillon sont mélangés à 0,25 mL de BaOH (0,3 M) et à 0,25 mL de ZnSO₄ (5%) puis sont centrifugés 5 min à 10000 g et sont filtrés (Filtre Millipore de 0,2 μ) avant d'être injectés. Un logiciel permet ensuite l'acquisition des données.

L'appareil utilisé est un chromatographe Agilent 1100. La chaîne HPLC utilisée est équipée de deux colonnes d'exclusion ionique (Phenomenex Rezex ROA 300 x 7,8 nm) montées en série et placées dans un four thermostaté à 50°C. L'éluant est une solution d'acide sulfurique 2 mM diluée dans de l'eau ultrapure (Millipore, MilliQ plus), dégazée en continu grâce à un

dégazeur (Ney, Ultrasonik 300) intégré à l'appareillage. Le débit d'élution est fixé à $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ à l'aide d'une pompe (HP série 1100, Agilent Technologies). Le chromatographe est muni d'un injecteur automatique à boucle fixe (Agilent vanne Rhéodyne) qui délivre $10 \text{ } \mu\text{L}$. Les différents composés présents dans l'échantillon sont détectés au moyen d'un réfractomètre (HP série 1100). Les signaux délivrés par le détecteur sont traités par un intégrateur (HP série 1100). L'acquisition est réalisée par le logiciel HPChem (Agilent Technologies). Les composés quantifiables par notre méthode sont le cellobiose, le glucose, le fructose, le succinate, le lactate, le formiate, l'acétate, le propionate, l'isobutyrate, le butyrate, l'isovalérate et le valérate, pour lesquels des gammes étalons ont été établies.

4.3 Dosage des ions ammonium

Le dosage utilisé est basé sur la réaction de Berthelot :

➤ Principe

Les ions ammonium en présence de javel et de phénol développent une coloration bleue. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la concentration en ions NH_4^+ . Le maximum de sensibilité est obtenu pour une longueur d'onde de 570 nm (Patton et Crouch, 1977)

➤ Procédure

$50 \text{ } \mu\text{L}$ d'échantillon sont mélangés à $0,5 \text{ mL}$ de javel, $0,5 \text{ mL}$ de phénol nitroprussiate et 3 mL d'eau. Après une heure d'incubation, la mesure au spectrophotomètre est réalisée à 570 nm . Au-delà de $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ d'azote, les échantillons doivent être dilués avec de l'eau distillée.

4.4 Mesure de la quantité de Na_2CO_3 ajoutée

A la fin de la culture la quantité de Na_2CO_3 ajoutée par la pompe asservie à la régulation du pH est pesée. Nous n'avons pas été en mesure de mettre en place une mesure en continu du débit apporté mais la quantité de carbonate ajoutée est prise en compte dans les bilans de façon globale.

5 TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE LA PHASE SOLIDE

5.1 Mesure de la dégradation des végétaux

Après la fermentation (Figure II.8), le contenu du réacteur est réparti dans des pots à centrifugation puis centrifugé 15 min à 16400 g (Jouan, KR22i). Les surnageants sont filtrés sur des filtres (Filtres : Schleicher et Schwell, 15 cm) préalablement séchés 1 h à 110°C et pesés. Ces filtres sont alors séchés pendant 24 h à 110°C, ce qui permet de mesurer la quantité de matière sèche résiduelle présente dans les surnageants.

Deux culots sont repris dans du surnageant puis filtrés et séchés à 110°C pendant 24 à 48 h. Cette méthode permet d'estimer la quantité de matière sèche (MS) dans les autres culots.

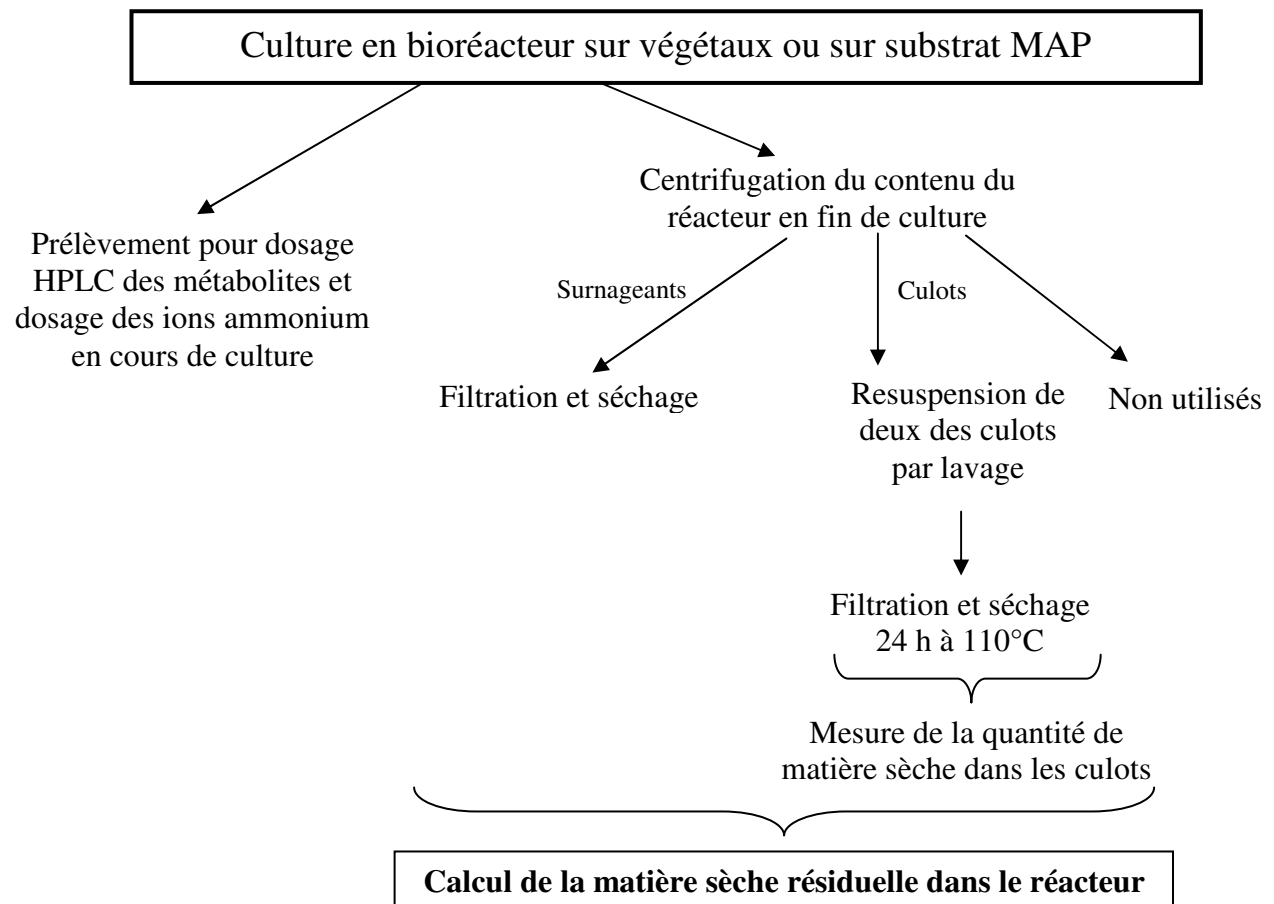


Figure II.8 : Protocole de détermination de la matière sèche en fin de fermentation

La quantité totale de matière sèche est obtenue par addition de l'estimation de la MS des culots et de la quantité de matière sèche des surnageants filtrés.

Le pourcentage de dégradation (d) est alors calculé de la façon suivante :

$$d = \frac{(MS_{introduite} - MS_{résiduelle})}{MS_{introduite}} \times 100$$

5.2 Analyses élémentaires

Les substrats solides après séchage à 60°C pendant 24 h sous vide, sont envoyés au service central d'analyses du CNRS (Centre National de Recherche Scientifique, Vernaison) pour déterminer la composition en carbone, azote, oxygène, hydrogène, phosphore et soufre. Les mêmes analyses ont été effectuées sur la biomasse sèche.

5.3 Composition en fibres

Les substrats solides après séchage à 110°C pendant 24 h sont traités pour déterminer leur composition en fibres. La méthode utilisée est celle de Van Soest (1967).

➤ Réactifs

- NDS : détergent neutre 1 L
 - SDS 30 g,
 - EDTA 18,61 g,
 - Borate de sodium decahydrate 6,81 g,
 - Phosphate de disodium hydrogène anhydre 4,56 g,
 - 2 ethoxyl ethanol 10 mL,
 - Ajuster à 1 L avec eau distillée.
- ADS : détergent acide 1 L
 - Cethyltrimethylammonium bromide 20 g,
 - Ajuster avec de l'acide sulfurique à 0,5 mol/L,
- Acide sulfurique à 72% (730 mL).

➤ Protocole

La première séparation s'effectue avec le détergent neutre (NDS) qui permet d'éliminer ce qui n'est pas des fibres. 1 g d'échantillon préalablement pesé (S) est chauffé à ébullition avec 100mL de NDS dans un ballon réfrigéré pendant 1h. Le mélange est filtré, lavé à l'eau bouillante, séché à l'acétone et filtré sur un fritté (40-90 μm) préalablement pesé (F). Le gâteau de fibres et le fritté sont séchés pendant au moins 12 h à 110°C et pesés (soit w1 le poids obtenu). Le gâteau de fibres est récupéré pour effectuer la deuxième séparation. Celle-ci est réalisée au détergent acide (ADS) qui permet d'éliminer l'hémicellulose. Le protocole de séparation est le même que précédemment mais avec le détergent acide. Le gâteau de fibres et le fritté sont pesés (soit w2 le poids obtenu) après séchage au moins 12 h à 110°C. Enfin, le fritté est mis à tremper pendant 3h dans l'acide sulfurique pour éliminer la cellulose et ne conserver que la lignine. Après filtration, rinçage à l'eau bouillante et 12 h de séchage, le fritté est pesé (soit w3 le poids obtenu).

➤ Mesure de la composition en fibres.

La première séparation permet d'obtenir la proportion de fibres totales :

Soit f_t le pourcentage de fibres totales : $f_t = \frac{(W1 \times 100)}{S}$ (avec $W1 = w1 - F$)

La deuxième séparation permet d'estimer la proportion d'hémicellulose :

Soit h le pourcentage d'hémicellulose : $h = \frac{(W1 - W2)}{S} \times 100$ (avec $W2 = w2 - F$)

La troisième séparation permet de séparer la cellulose et la lignine et d'obtenir leurs proportions dans l'échantillon :

Soit c le pourcentage de cellulose : $c = \frac{(W2 - W3)}{S} \times 100$ (avec $W3 = w3 - F$)

Soit l le pourcentage de lignine : $l = \frac{W3}{S} \times 100$

➤ Mesure de la dégradation des différentes fractions.

Le pourcentage de dégradation est obtenu de la manière suivante :

d : pourcentage de dégradation

$100 - d$: pourcentage de résidu

f_t : pourcentage de fibres totales

h : pourcentage d'hémicellulose

c : pourcentage de cellulose

l : pourcentage de lignine

d_{ft} : pourcentage de dégradation des fibres totales

La détermination de la dégradation des différentes fractions composant un extrait sec est effectuée de la façon suivante :

$$100 - d_{ft} = \frac{m_{\text{fibres totales résidu}}}{m_{\text{fibres totales substrat}}} \times 100$$

$$m_{\text{fibres totales substrat}} = \frac{f_{ts} MS_{\text{introduite}}}{100}$$

$$m_{\text{fibres totales résidu}} = \frac{f_{ts} MS_{\text{résidu}}}{100} = \frac{f_{tr}}{100} \left(1 - \frac{d}{100} \right) MS_{\text{introduite}}$$

$$100 - d_{ft} = \frac{f_{tr} (100 - d)}{f_{ts}}$$

d'où

$$d_{ft} = \left[100 - (100 - d) \frac{f_{tr}}{f_{ts}} \right]$$

donc

$$d_{ft} = \left[1 - \left(1 - \frac{d}{100} \right) \frac{f_{tr}}{f_{ts}} \right] \times 100$$

De la même manière :

$$d_h = \left[1 - \left(1 - \frac{d}{100} \right) \frac{h_r}{h_s} \right] \times 100$$

$$d_c = \left[1 - \left(1 - \frac{d}{100} \right) \frac{c_r}{c_s} \right] \times 100$$

$$d_l = \left[1 - \left(1 - \frac{d}{100} \right) \frac{l_r}{l_s} \right] \times 100$$

6 MODELISATION

6.1 Le programme de simulation et de modélisation

Le programme "Anaerobic Waste Compartment Modelling and Simulation" a été mis au point au Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique (LGCB) pour simuler les cultures de micro-organismes utilisés dans le projet MELiSSA (Poughon, 2000). Ce programme permet :

- l'étude et le développement de modèles dynamiques du premier compartiment de la boucle MELiSSA,
- la détermination du modèle le plus fiable,
- l'identification des coefficients du modèle.

Différentes étapes sont des préalables indispensables à la simulation. La simulation en elle-même est la dernière étape du processus (Figure II.9).

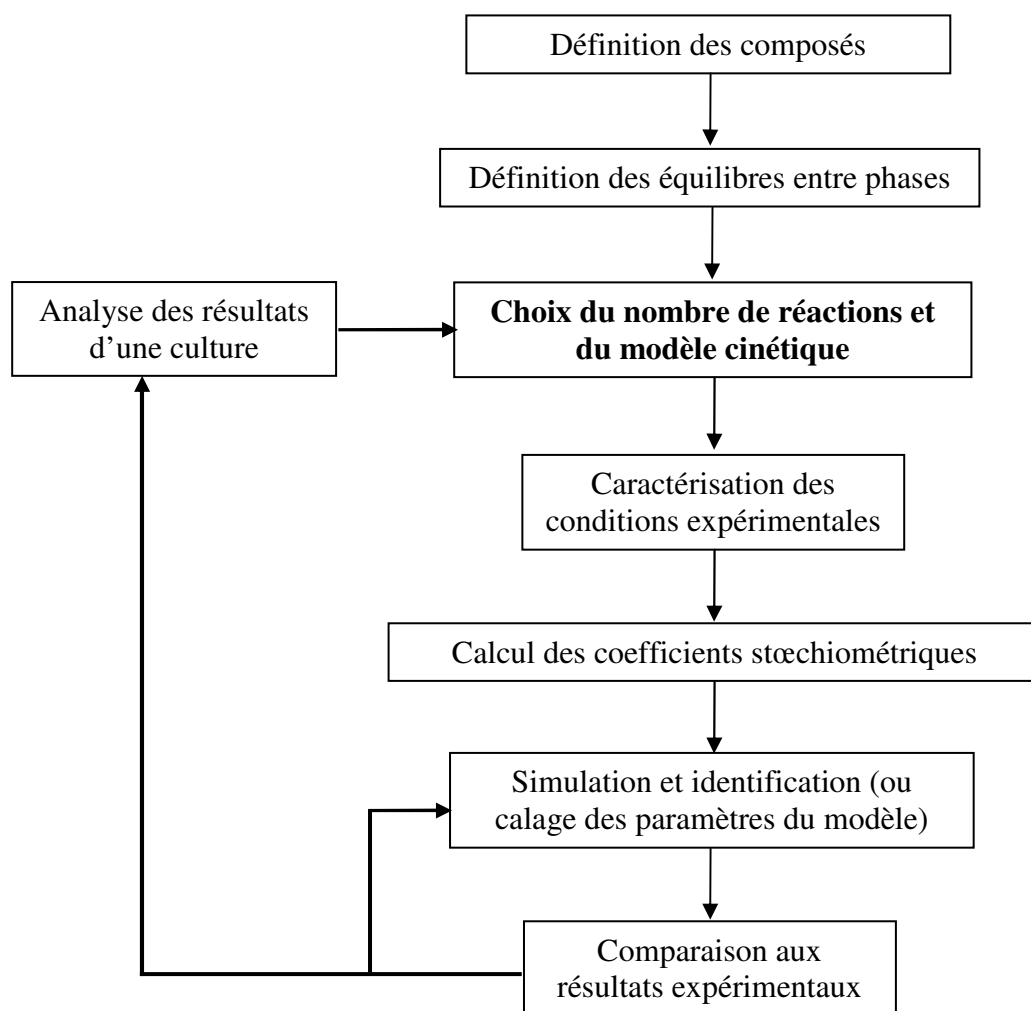


Figure II.9 : Etapes de la modélisation du programme "Anaerobic Waste Compartment Modelling and Simulation"

6.1.1 Définition des composés

Dans le programme tous les composés (Figure II.10) intervenants dans la simulation doivent être présents. Pour chacun des corps, il existe quatre champs :

- le nom du corps,
- sa composition élémentaire (C, H, O, N, S, P),
- sa masse molaire,
- sa masse volumique.

Les champs « nom du corps », « composition » et « masse molaire » sont obligatoires ; l'entrée des compositions élémentaires permet au programme de vérifier à terme si l'équation stoechiométrique est équilibrée en réalisant un bilan massique sur l'ensemble des constituants. C'est pour nous un point capital car ce travail prend en compte la contrainte de conservation des éléments par la définition des stoechiométries des réactions.

The screenshot shows a software window titled "Definition des Composés". At the top, there is a field "Nombre de corps" with the value "9". Below this is a table with the following columns: "Nom du corps", "Composition" (subdivided into C, H, O, N, S, P), "Masse Molaire (g/mol)", and "Masse volumique". The table contains five rows of data:

	Nom du corps	C	H	O	N	S	P	Masse Molaire (g/mol)	Masse volumique
Corps 1	Sub	1	1.6	0.6	0.08	0	0	22.72	0
Corps 2	Carbo	1	0	3	0	0	0	105.99	0
Corps 3	Bio	1	1.6	0.4	0.2	0	0	22.8	0
Corps 4	Acet	1	2	1	0	0	0	30	0
Corps 5	But	1	2	0.5	0	0	0	22	0

At the bottom right of the window are two buttons: "Annuler" (orange) and "Enregistrer" (green).

Figure II.10 : Définition des composés

6.1.2 Définition des équilibres

Pour chaque corps qui peut exister sous plusieurs états en équilibre (gaz, liquide, protoné, non protoné...etc.), il est nécessaire de définir les équilibres gaz/liquide (Figure II.11) et les

équilibres acide/base (Figure II.12). De même il faut définir le sens de l'équilibre et la valeur du coefficient de partage à une température donnée et à une pression d'une atmosphère. Pour tous les corps, l'équilibre gaz/liquide conduit à un coefficient de partage soit nul, soit infini. En d'autres termes, nous avons considéré que ces corps restaient à l'état dissous au cours de la réaction, à l'exception du CO_2 qui est sous forme gaz au cours de la culture. Le calcul de la concentration de CO_2 dissous à pH 6 sous une pression de 1 atm montre que la quantité dissoute peut être négligée en première approximation. De même nous n'avons pas défini les équilibres acide/base en considérant que tous les acides étaient équivalents à leur forme protonée.

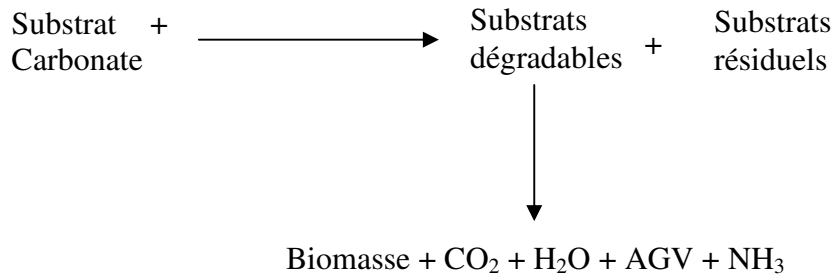
6.1.3 Choix du nombre de réactions et du modèle

Le comportement biologique peut être représenté par une ou plusieurs réactions, chaque réaction nécessitant la définition du modèle cinétique qui la régit (équation de Monod/Pirt/Andrews, réaction enzymatique, réaction de maintenance...etc.).

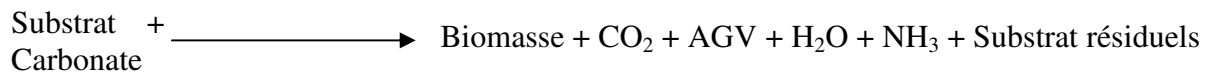
Le programme nécessite la saisie des coefficients stœchiométriques afin de réaliser la simulation pour que chaque réaction soit définie sur le plan des bilans matière. Certains de ces coefficients doivent être déterminés à partir des rendements expérimentaux.

Dans les expériences réalisées, le substrat n'est pas dégradé en totalité, il existe un substrat résiduel en fin de réaction. Pour tenir compte de la dégradation partielle il existe deux solutions.

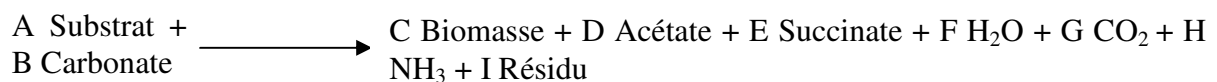
- Considérer deux équations couplées : une première équation rend compte de la réaction de dégradation du substrat en substrats dégradables et en substrats résiduels ; une deuxième équation rend compte de l'assimilation du substrat dégradable par la biomasse pour synthétiser les différents produits. Cette méthode nécessite de connaître les informations liées aux enzymes (K_s) et de mesurer l'évolution des substrats dégradable et résiduel au cours du temps pour pouvoir déterminer les coefficients stœchiométriques de l'équation.



- Considérer une seule équation : à partir du substrat initial, cette équation caractérise la formation du substrat résiduel et de l'ensemble des produits. Cette deuxième méthode ne rend pas compte des étapes intermédiaires de dégradation du substrat mais seulement de l'état initial et de l'état final. Elle correspond à une approche de type boîte grise : on considère l'état final et l'état initial mais on ne modélise pas ce qui se passe dans les étapes intermédiaires. Cette méthode est moins précise mais elle est plus facile à utiliser puisqu'elle nécessite moins d'informations que la première.



Comme nous ne possédons pas les informations nécessaires pour modéliser le système par la première méthode (évolutions des substrats dégradés et résiduels au cours du temps), nous avons choisi la deuxième méthode en utilisant une seule équation. De façon globale, ceci s'écrit :



Les coefficients A, B, C, D, E, F, G, H et I sont les 9 coefficients stoechiométriques et doivent être déterminés grâce aux rendements massiques expérimentaux qui permettent de calculer les rendements molaires. Deux types de rendements molaires peuvent être utilisés : les rendements calculés par rapport à la biomasse ou ceux calculés par rapport au substrat.

En d'autres termes, un coefficient stoechiométrique est fixé à 1. Il reste donc $9-1 = 8$ coefficients à calculer. Il y a 4 équations de conservation des éléments C, H, O, N. Par

conséquent, si nous avons 4 équations impliquées dans le calcul de 8 coefficients stoechiométriques, les informations restantes nécessaires résultent de la connaissance expérimentale de $8-4 = 4$ rendements mesurés. Le calcul, sous forme matricielle, permet également de modifier les rendements expérimentaux afin d'observer très rapidement leur influence sur les simulations et de comparer avec les résultats expérimentaux. Il faut souligner que cette approche rend compte de la conservation de tous les éléments C, H, O et N.

6.1.4 Calcul des rendements massiques

6.1.4.1 Détermination de la composition C-molaire des constituants du milieu

Les compositions C, N, O, H du substrat et des résidus ont été obtenues par des analyses élémentaires effectuées par le CNRS. La composition C, N, O, H de la biomasse a été obtenue de la même manière. Le tableau II.1 représente un exemple de composition (en pourcentage massique) d'un substrat et d'un résidu.

	C	H	O	N	S	P
Substrat	47,32	6,17	32,71	3,51	1,75	1,02
Résidu	43,14	5,88	34,54	4,29	0,88	0,80

Tableau II.1 : Exemple analyses élémentaires du CNRS en pourcentage massique de matière sèche.

Avec ces pourcentages massiques du substrat et du résidu, nous pouvons déterminer les compositions C-molaires de chaque élément (Tableau II.2).

Si on prend l'exemple du substrat :

Le pourcentage massique de C est de 47,32% (Masse molaire C = 12 g.mole⁻¹)

Donc dans 1 g d'échantillon sec, il y a : $47,32/12 = 3,94$ atome-g de C.

De même, il y a : $3,51/14 = 0,25$ atome-g de N.

De même, il y a : $6,17/1 = 6,17$ atome-g de H.

De même, il y a : $32,71/16 = 2,04$ atome-g de O.

En ramenant ces quantités à 1 atome-g de C on obtient :

$0,25/3.94 = 0,064$ atome-g de N.

$6,17/3,94 = 1,564$ atome-g de H.

$2,04/3,94 = 0,518$ atome-g de O.

Ces calculs fournissent la formule C-molaire de l'échantillon $\text{CH}_{1,564}\text{O}_{0,518}\text{N}_{0,064}$

Ces calculs sont effectués pour tous les composés intervenant dans l'équation.

Ceci a été effectué pour tous les corps présents dans les différentes cultures. Les formules C-molaires de ces corps sont regroupées dans le tableau II.2.

Corps	Formules C-molaire				Masse molaire gC.C-mole ⁻¹
	C	H	O	N	
Glucose	1	2	1	0	30,00
Substrat Végétaux (mélange)	1	1,71	0,66	0,074	25,35
Paille	1	1,57	0,72	$5,6 \cdot 10^{-3}$	25,18
Chou	1	1,84	0,87	0,048	28,41
Soja	1	1,73	0,43	0,16	22,79
Substrat MAP	1	1,66	0,59	0,085	24,22
NH ₃	0	3	0	1	17,00
Carbonate	1	2	3	0	62,01
Résidus Végétaux (mélange)	1	1,72	0,49	0,12	23,19
Résidus MAP	1	1,66	0,53	0,063	23,08
Succinate	1	1,50	1,00	0	29,48
Acétate	1	2	1	0	30,00
Butyrate	1	2	0,50	0	22,02
Propionate	1	2	0,67	0	24,69
Formiate	1	1	2	0	45,01
Biomasse	1	1,59	0,40	0,20	22,79
H ₂ O	0	2	1	0	18,00
CO ₂	1	0	2	0	43,96

Tableau III.2 : Composition des corps présents dans les différentes cultures

6.1.4.2 Exemple de détermination des rendements

Pour chaque métabolite produit, nous avons mesuré soit l'évolution de la concentration en fonction du temps, soit les quantités initiales et finales. Les rendements (Y) par rapport à la biomasse sont ensuite calculés.

Considérons par exemple une production d'acétate, de formule C-molaire CH_2O , de $1,58 \text{ g.L}^{-1}$ et une concentration finale en biomasse (de formule C-molaire $\text{CH}_{1,59}\text{O}_{0,4}\text{N}_{0,2}$) de $9,56 \text{ g.L}^{-1}$.

Le rendement massique du acétate/biomasse est de $1,58/9,56 = 0,165 \text{ gAcé/gbiom.}$

Le rendement molaire est obtenu grâce aux masses molaires :

($M_{\text{biomasse}} = 22,8 \text{ gC.C-mole}^{-1}$ et $M_{\text{acétate}} = 30 \text{ gC.C-mole}^{-1}$)

donc $Y_{\text{acétate/biomasse}} = 0,165 * 22,79/30 = 0,126 \text{ C-moleAcé.C-mole}^{-1} \text{ biom.}$

Les mêmes calculs sont effectués pour les rendements molaires par rapport au substrat.

Le calcul des rendements molaires permet de définir les coefficients stochiométriques des équations de chacune des réactions par résolution matricielle. Pour cela, chaque rendement est alors remplacé par sa valeur calculée dans une matrice où on fixe un rapport Substrat/substrat à 1 pour calculer les rendements par rapport au substrat. L'inversion de la matrice, réalisée sous Excel™, donne accès au vecteur colonne comportant les coefficients de la réaction précédemment notés (A, B, C, D, E, F, G, H et I).

7 RECHERCHE DE CONTAMINANTS PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE

7.1 Démarche expérimentale

Les manipulations ont été menées au laboratoire de microbiologie et de radiobiologie au SCK-CEN (Centre d'étude pour l'énergie nucléaire, Mol, Belgique). Des prélèvements de réacteur (fermentation sur glucose, sur végétaux, sur le substrat MAP) et une culture en tube de Hungate ont été utilisés.

Ce travail s'est déroulé en trois étapes (Figure II.11) :

- Identification globale des espèces présentes par PCR (Polymerase Chain Reaction) utilisant des amorces spécifiques de groupes et des amorces universelles incapables d'amplifier *Fibrobacter* après culture des prélèvements sur différents milieux,
- Analyse de la diversité microbienne des prélèvements par PCR utilisant des amorces universelles et des amorces spécifiques GC clamp afin d'effectuer des gels DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis),
- Identification des espèces cultivables par cultures sur milieux solides et isollements des colonies suivis de PCR avec des amorces universelles et d'un séquençage.

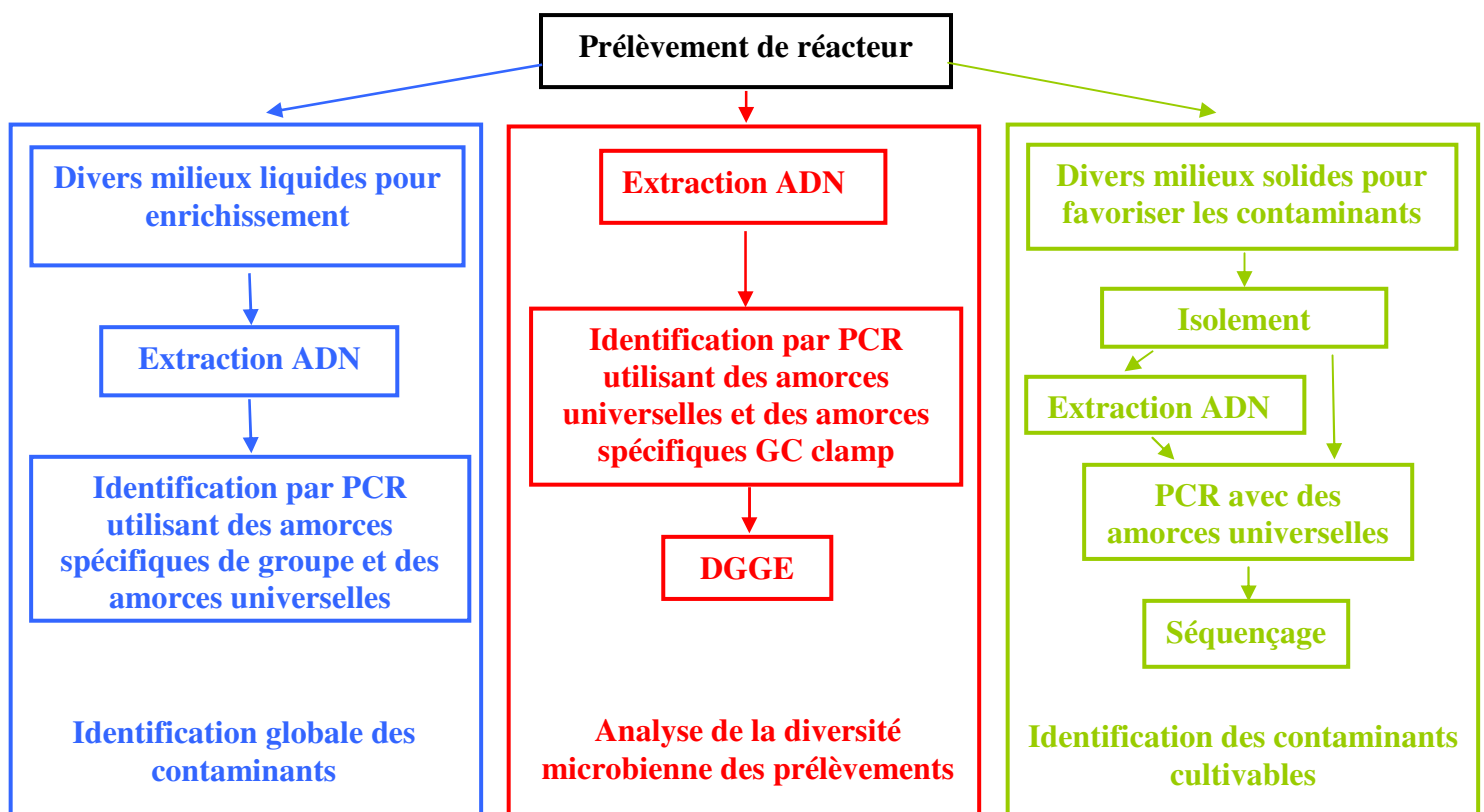


Figure II.11 : Plan d'expériences

7.2 Les milieux de cultures

Les prélèvements du bioréacteur ont été mis en culture sur différents milieux solides et liquides. Les milieux 869, 284 glucose, 284 succinate, sistrom glucose et sistrom succinate ont été utilisés à 39°C en aérobie et en anaérobie (Annexe 4). L'emploi de différents milieux avec différentes sources de carbone permet de discriminer certaines bactéries par rapport à d'autres. Par exemple l'emploi d'un milieu dont la seule source de carbone est le succinate permet de favoriser le contaminant potentiel qui en réacteur consomme le succinate produit par *Fibrobacter succinogenes* pour produire le butyrate.

7.3 Extraction d'ADN

L'ADN des différents milieux liquides et des colonies isolées sur milieux solides, a été extrait. Pour les milieux liquides l'ADN a été extrait par la méthode Fastprep de la manière suivante : 3 mL de culture (2x1,5 mL) sont centrifugés 5 min à 1200 g. Le culot ainsi obtenu est repris dans 200 µL de TE (Trisbase 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) auquel 50 µL de lysozyme (5 mg.mL⁻¹) pH 7 et 30 µL de RNase (10 mg.mL⁻¹) sont ajoutés. Le mélange est incubé 30 min au moins à 37°C. Puis il est transféré dans un tube de Fastprep qui contient 0,2 g de billes en verre (212-300 µm, Sigma) auquel 30µL de SDS à 10% et 200µL de phénol-chloroforme sont ajoutés. Après deux cycles d'agitation (Fastprep) de 40 s puissance 6 et une centrifugation 5 min à 14000 rpm, le surnageant est prélevé délicatement. A celui-ci est ajouté 1/10 volume d'acétate de sodium et 2,5 volume d'éthanol absolu et le tout est incubé 1 h à -20°C. Après une centrifugation de 20 min à 1400 g (4°C), un lavage à l'éthanol 70% (-20°C), une seconde centrifugation est réalisée 5 min à 1600 g afin de récupérer l'ADN se trouvant dans le culot. Celui-ci est séché et suspendu dans 100 µL de TE. Il est enfin conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Pour les milieux solides, l'ADN des colonies isolées a été extrait soit par la méthode Fastprep soit les colonies ont été intégrées directement au mix de PCR.

7.4 PCR (Polymerase chain reaction)

La PCR est une technique d'amplification d'un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues par un procédé d'extension d'amorce. Elle consiste à utiliser deux amorces oligonucléotidiques de synthèse complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Une de ces amorces est une copie du brin codant, et l'autre une copie du brin non codant. Sous l'action d'une enzyme (Taq polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'→3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié. La répétition des cycles aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible considérée.

Le mix de PCR utilisé contient par réaction 5 µL dNTP (2,5 mM), 2 µL 10x tampon, 1 µL de l'amorce sens (3 µM), 1 µL de l'amorce anti-sens (3 µM), 5 µL d'ADN et 1 µL d'eau ultra pure. Le programme PCR utilisé est 5 min à 94°C suivi de 20 s à 80°C. Ces deux étapes correspondent au hotstart (initialisation). Ensuite les échantillons sont plongés dans la glace pour ajouter la Taq polymérase. En effet, durant les 5 min à 94°C, les deux brins d'ADN vont se séparer et l'action de la glace va être de les empêcher de se réassocier, ainsi l'ajout de la Taq à ce moment permet d'améliorer son action. Le hotstart est suivi de 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à T_m (température d'hybridation spécifique des amorces utilisées) et 1 min à 72°C, ces 35 cycles sont ensuite suivis de 10 min à 72°C pour permettre de terminer l'hybridation (Figure II.12). Enfin la température des produits PCR est maintenue à 4°C jusqu'à leur récupération et ils sont stockés à cette température. Les produits PCR obtenus sont également appelés amplicons.

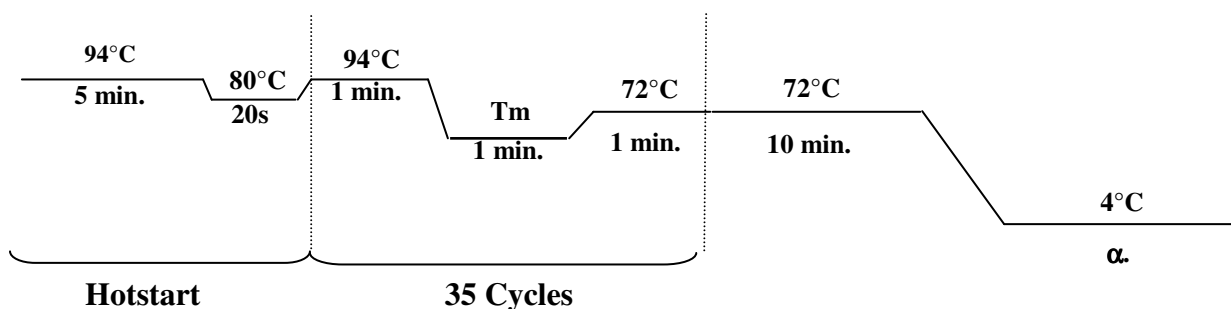


Figure II.12 : Programme PCR utilisé

Les différents couples d'amorce utilisés sont présentés en annexe 5.

La vérification de la présence d'amplifions se réalise grâce à une électrophorèse. Les électrophorèses sont réalisées sur un gel d'agarose à 1% contenant 1/10000 du volume de bromure d'éthidium. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon (TBE) tris-borate-EDTA (5,5 g.L⁻¹ acide borique, 0,744 g.L⁻¹ d'EDTA et 10,8 g.L⁻¹ de Tris). 10 µL des produits PCR sont mélangés à 2 µL de colorant (4 g de sucrose et 2,5 mg de bleu de bromophénol dans 6 mL de tampon TE (Trisbase 10 mM, EDTA 1 mM)) avant d'être déposés. En parallèle un marqueur de taille (100 bp) est déposé. La migration s'effectue à 100 V pendant 2 h.

7.5 DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)

La migration d'ADN se fait dans un gel de polyacrylamide où il rencontre des concentrations croissantes d'agents dénaturants (urée+formamide), dont le rôle est de mimer une augmentation linéaire de la température du haut vers le bas du gel. La dissociation transforme le fragment d'ADN en une structure partiellement ouverte et crée une diminution de sa mobilité, qui conduit l'ADN à se concentrer en un point du gel. La migration des molécules est de ce fait très dépendante de la séquence. La séparation complète des deux brins est empêchée par la présence d'un domaine artificiellement créé à une extrémité de la molécule par incorporation d'une bride GC. Ceci est accompli pendant l'amplification de PCR à l'aide d'une amorce de PCR avec une extrémité 5' se composant d'un nombre important de GC.

Le gel DGGE (Figure II.13) est préparé en mélangeant, grâce à un système de vases communicants, deux solutions à 8% d'acrylamide (24 mL) l'une contenant 35% et l'autre 65% d'agent dénaturant avec 100 µL d'APS (ammonium persulfate) à 10% et 5 µL de TEMED (N,N,N',N'-tetra methyl ethylen diamine).

Une fois que le gel dénaturant est polymérisé, un second gel de concentration est ajouté au dessus, celui-ci est préparé en mélangeant 10 ml d'une solution à 8% d'acrylamide avec 200 µL d'APS et 10 µL de TEMED. La migration s'effectue en deux temps, le premier à 200 V pendant 15 min pour une migration dans le stacking, puis à 120 V pendant 16 h avec une circulation du tampon dans le bain, celui-ci étant à 60°C.

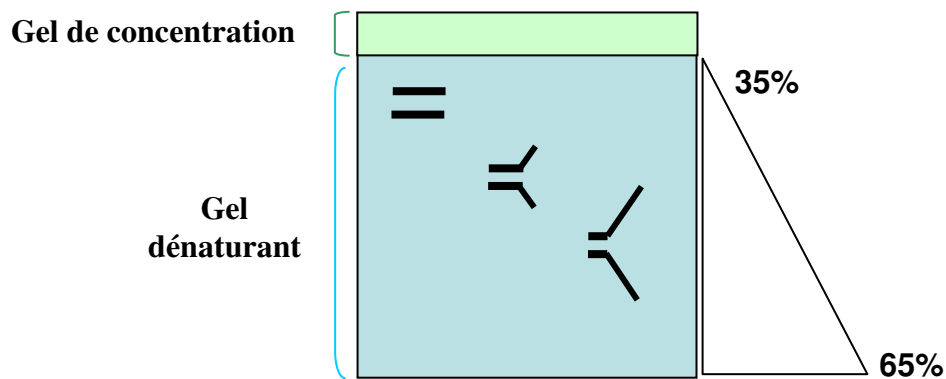


Figure II.13 : Gel DGGE

Une fois la migration terminée, la migration sur le gel est visualisée sous UV. L'image du gel est transmise à un ordinateur via une caméra. Ceci permet, grâce à un logiciel de comparaison, d'identifier les bandes obtenues sur le gel. En effet, tous les ADN migrent de façon différente dans le gel, donc par comparaison avec une banque de données, nous pouvons connaître l'origine de l'ADN déposé sur le gel.

7.6 Le séquençage

Le séquençage a été effectué sur l'ADN extrait de colonies isolées à partir des milieux solides. Après l'isolement des colonies, des PCR ont été effectuées sur celles-ci, soit directement en prélevant une colonie sur une boîte et en l'intégrant au mix de PCR, soit après extraction de l'ADN (méthode Fastprep).

Le séquençage a ensuite été effectué. Dans un premier temps, les gels de PCR ont été découpés afin de récupérer les produits d'amplification PCR (amplicons). Ces amplicons ont été ensuite purifiés. La purification a été effectuée avec le kit « Wizard® SV gel and PCR clean-up system » de Promega sur les amplicons de colonies. Les produits PCR purifiés ont été ensuite dilués afin d'obtenir entre 5 et 20 ng d'ADN dans 9 µL. Ces produits PCR ainsi dilués sont réamplifiés avec les mêmes couples d'amorces. Cependant la réamplification se

fait avec un mix contenu dans un kit (BigDye®Terminator v1.1 cycle sequencing kit) et les mêmes amorces, mais une par une. Enfin les produits PCR sont déposés dans le séquenceur. Les séquences obtenues sont comparées aux banques de séquences disponibles en ligne avec le programme en ligne NCBI BLAST.

8 RECAPITULATIF DES EXPERIENCES

Le récapitulatif des expériences qui ont été faites est fourni par la figure II.14.

Les résultats obtenus sont détaillés dans les chapitres suivants.

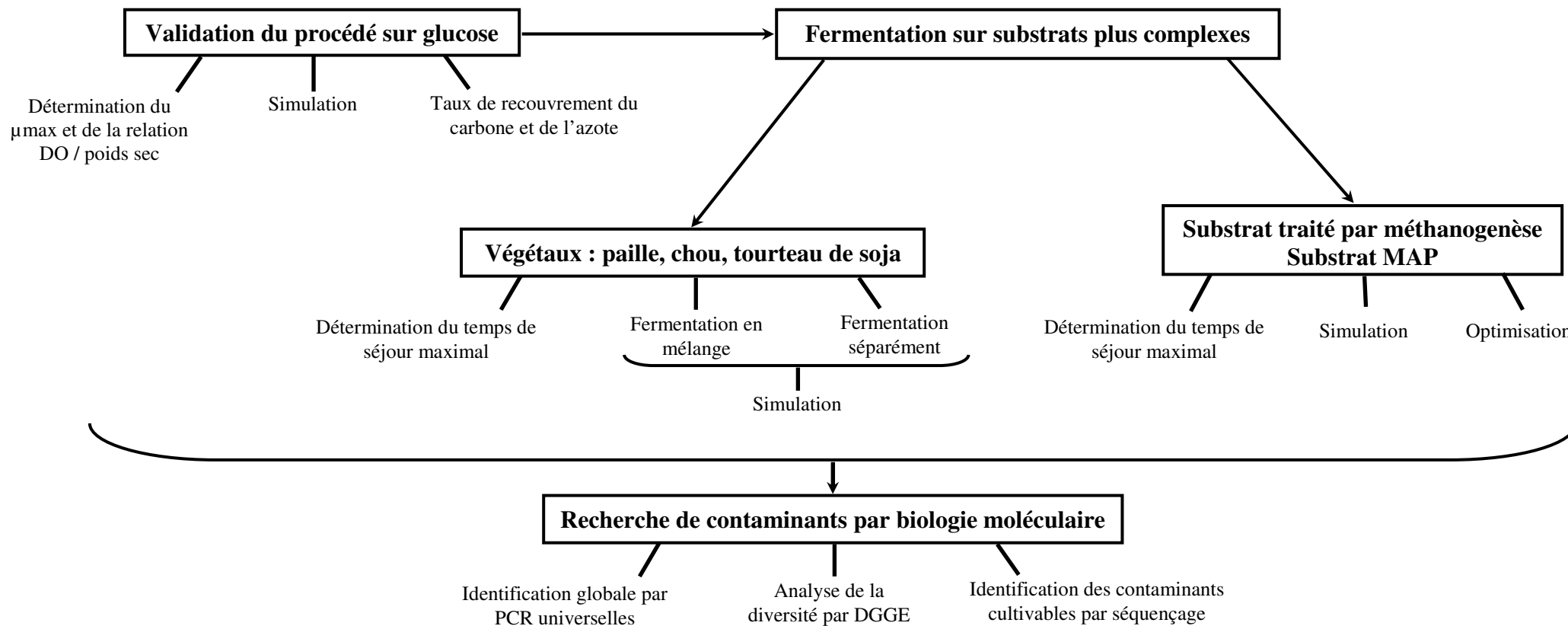


Figure II.14 : Récapitulatif des expériences réalisées dans ce travail.

9 RECAPITULATIF

- **Condition de culture**
 - La souche utilisée est la souche de *Fibrobacter succinogenes* S85 ATCC 19169.
 - Deux milieux sont utilisés : un milieu de conservation avec du jus de rumen et un milieu de propagation ou synthétique sans jus de rumen.
 - Quatre sources de carbone : le cellobiose (en tubes et en Erlenmeyer) pour les pré-cultures, le glucose, les végétaux (paille, chou, tourteau de soja en mélange ou séparément) et un substrat traité par méthanogenèse pour les cultures en bioréacteur.
- **Pour la mise en culture deux types de réacteur ont été utilisés**
 - Un bioréacteur (5 L total et 4 L utile) autoclavable, agité, équipé de sondes pH (avec régulation de pH), redox, température, d'une entrée et d'une sortie de gaz avec un système de récupération de gaz et relié à un système d'acquisition en ligne.
 - Le RUSITEC qui permet l'étude de l'influence du temps de séjour. Il est composé de 4 unités de 1 L. Les unités de culture sont agitées, régulées en température et équipées d'un système de prélèvement et d'inoculation.
- **Traitement de la phase liquide**
 - Détermination de la relation poids sec / DO.
 - Dosage des métabolites par HPLC.
 - Dosage des ions ammonium par la réaction de Berthelot.
 - Mesure de la quantité de Na_2CO_3 ajoutée pour la régulation de pH.
- **Traitement de la phase solide**
 - Mesure du taux de dégradation par centrifugation et séchage (110°C, 24 h).
 - Analyses élémentaires (CNRS, Vernaison) pour déterminer la composition C, H, O, N, S et P des substrats, des résidus et de la biomasse.
 - Détermination de la composition en fibres par la méthode de Van Soest (1967).
- **Modélisation grâce au programme « Anaerobic Waste Compartment Modelling and Simulation » mis au point au laboratoire par Poughon (2000).**
- **Recherche de contaminants par des techniques de biologie moléculaire**
 - Identification globale par amplification PCR avec des amorces universelles.
 - Analyse de la diversité par amplification PCR avec des amorces spécifiques GC-clamp pour effectuer des DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis).
 - Identification des contaminants cultivables par amplification PCR avec des amorces universelles puis séquençage.

CHAPITRE III

VALIDATION DU PROCEDE ET DES METHODES DE CARACTERISATION DES CULTURES

1 INTRODUCTION

Le but de ce chapitre est de valider le procédé anaérobie développé pour la culture de *Fibrobacter succinogenes* dans un premier temps sur glucose en vue de l'appliquer pour la dégradation de végétaux. En effet, *Fibrobacter succinogenes* est connu pour posséder un complexe enzymatique très performant vis-à-vis des parois des cellules végétales et un grand nombre d'auteurs ont montré l'efficacité des enzymes ((Dekker, 1976, 1985 ; McGavin et Forsberg, 1988 ; Gong *et al.*, 1989 ; Huang et Forsberg, 1990 ; McGavin *et al.*, 1990 ; Smith et Forsberg, 1991 ; Malburg *et al.*, 1996 ; Lynd *et al.*, 2002 ; Matheron *et al.*, 2002a et b). Cependant très peu d'auteurs ont mis au point des procédés de dégradation de végétaux utilisant *F.s.*. Du fait de ce manque de données dans la littérature, lors de la mise au point nous avons été confrontés à plusieurs problèmes d'ordre technique.

L'un des problèmes rencontré est lié au maintien des conditions favorables pour la croissance de *F.s.* car, nous l'avons précisé dans la partie « étude bibliographique », cette bactérie est très sensible aux conditions environnementales telles que la température, le pH, un potentiel d'oxydo-réduction faible associé à une anaérobiose stricte. En ce qui concerne le pH, une régulation a été ajoutée afin de le maintenir à une valeur de 6,01. La pompe péristaltique reliée au système de contrôle permet une injection automatique de Na_2CO_3 dans le réacteur chaque fois que le pH descend à une valeur de 6. En effet, *F.s.* produit des AGV qui ont tendance à diminuer le pH ce qui impose de le maintenir à 6,01 par injection de la solution basique (Na_2CO_3). La température est mesurée par une sonde et est régulée. Le potentiel redox est suivi grâce à une sonde introduite dans le réacteur et lorsque les conditions de redox (très réductrices) n'ont pu être maintenues, les manipulations ont été interrompues.

La contrainte la plus importante sur les conditions de culture concerne l'anaérobiose stricte. Ces conditions d'anaérobiose ont été satisfaites en mettant le réacteur sous pression de CO_2 en début de manipulation et sous flux de CO_2 lors des prélèvements ou d'addition de substrat. Cependant, ceci nécessite la tenue en pression du réacteur car la culture est réalisée en anaérobiose stricte et à une pression située entre 1,2 et 1,5 bars, pour permettre le développement de la bactérie. Dans un premier temps, après l'inoculation, la pression est élevée artificiellement (1,2 bars) pour se placer dans les conditions de développement optimum de la bactérie. Ensuite, lorsque la bactérie se développe, elle produit elle-même du CO_2 qui élève la pression dans le réacteur. Tout au long de la culture, le réacteur est saturé en

CO₂. Lorsque la bactérie produit du CO₂, la pression s'élève dans le réacteur et l'électrovanne mise en place libère du gaz lorsque la pression atteint 1,5 bars de manière à stabiliser la pression à 1,2 bar dans le réacteur. Le gaz libéré est envoyé dans une colonne graduée permettant une mesure de la production de CO₂ (cf. 2.2.1.3).

La culture doit pouvoir être maintenue plusieurs semaines. Ceci nécessite une très bonne étanchéité du réacteur pour ne pas fausser les mesures de volume de gaz produit. Durant les premières cultures, nous avons été confrontés à des problèmes importants de fuites dans le circuit et aucune indication sur volume de gaz produit n'a pu être récoltée.

Un test de tenue en pression est donc indispensable à chaque culture, d'une part pour vérifier l'état des différents joints du réacteur, d'autre part pour vérifier que toutes les connexions entre le réacteur et le reste du système n'ont pas de fuite. Les joints et l'étanchéité générale de chaque réacteur sont testés avant chaque inoculation par mise sous pression de CO₂ du réacteur. Le maintien de la pression est vérifié grâce à un capteur de pression relié à l'acquisition. En cas de perte de pression, les fuites sont recherchées à l'aide d'eau savonneuse et réduites. Le suivi d'un test de mise sous pression est représenté sur la figure III.1.

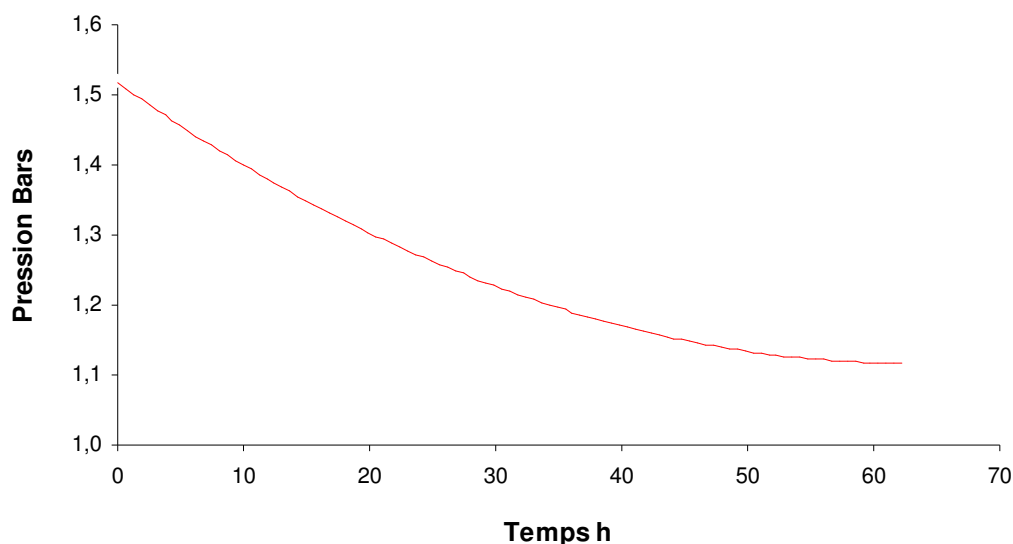


Figure III.1 : Test de tenue en pression du réacteur

La chute de pression semble inévitable compte tenu des pertes au niveau du joint entre la platine et la cuve en verre et dans l'exemple ci-dessus (Figure III.1), le profil obtenu paraît indiquer un phénomène diffusionnel plutôt qu'une véritable fuite. Nous estimons que dans cet état (fuite de 0,006 bars/h), l'installation permet de maintenir des conditions d'anaérobiose satisfaisantes. En effet la pression au sein du réacteur reste tout de même supérieure à la pression atmosphérique après 60 heures, ce qui limite de toute évidence l'introduction d'oxygène dans le réacteur.

Enfin, le pouvoir corrosif du milieu du fait de l'acidité et du potentiel d'oxydoréduction faible, nous a contraints au changement régulier des sondes pH et redox et à leur étalonnage très régulier.

Pour fixer ces conditions qui concernent « l'environnement technologique » de la culture, nous avons réalisé plusieurs cultures sur glucose. Seules sont présentées ici les fermentations dont tous les paramètres ont pu être suivis : température, pH, pression, métabolites...etc.

2 DETERMINATION DU TAUX DE CROISSANCE ET ESTIMATION DU POIDS SEC

2.1 Détermination du taux de croissance

Des expériences préliminaires ont été réalisées en tubes scellés permettant de suivre la croissance par mesure de densité optique en semi-continu.

Fibrobacter succinogenes est cultivée en tubes de Hungate dans le milieu sans le jus de rumen. Le milieu est préparé (300 mL) en flacon de 500 mL et répartis en tubes de Hungate à raison de 10 mL par tube, sous flux de CO₂ puis sont autoclavés. Avant la répartition en tube, le pH est vérifié pour qu'il se situe entre 5,5 et 7. Les tubes sont inoculés avec un volume suffisant pour obtenir une absorbance à 600 nm entre 0,200 à 0,300. La croissance de *F.s.* est suivie par la mesure régulière de l'absorbance à 600 nm sur un spectrophotomètre (Milton Roy, spectronic 20D) qui accepte les tubes ce qui permet de garantir une anaérobiose stricte. Toutes les cultures ont été effectuées en triplicats.

Les résultats sont reportés sur la figure III.2. On constate que dans les conditions d'un tube scellé la croissance dure environ 12 h. Elle est suivie par une phase plus lente de décroissance qui correspond à de la lyse cellulaire.

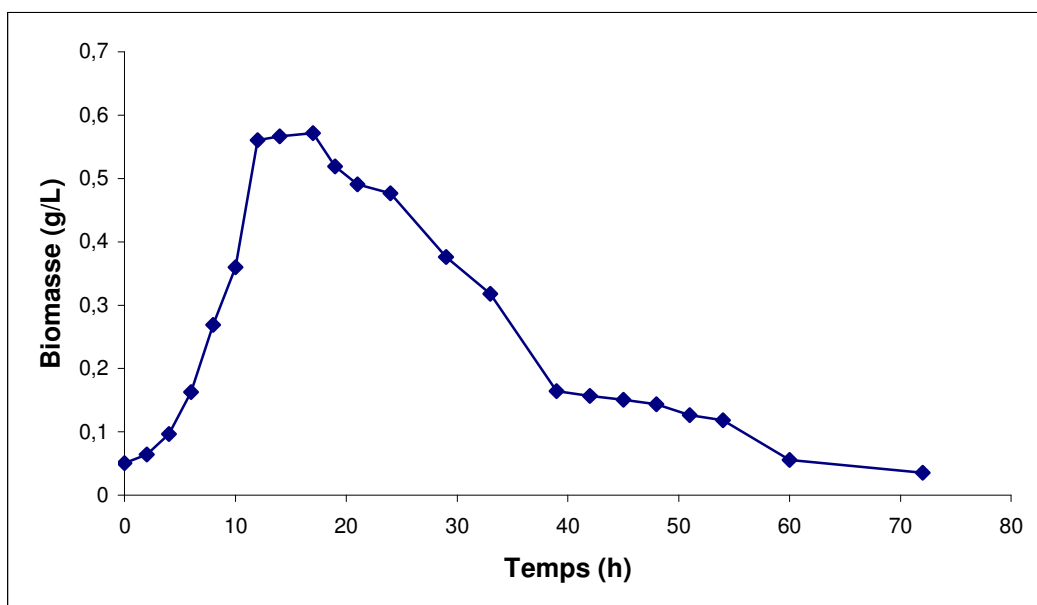


Figure III.2 : Evolution de la concentration en biomasse en tube scellés.

Les résultats tracés en échelle semi-logarithmique sont reportés dans la figure III.3. Les deux phases précédentes peuvent être simulées par des droites, ce qui correspond donc à une phase de croissance exponentielle suivie d'une phase de mortalité traduite par une constante du premier ordre. Les résultats des régressions donnent :

Taux de croissance : $\mu_{\max} = 0,22 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$

Constante de mortalité : $k = 0,05 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$

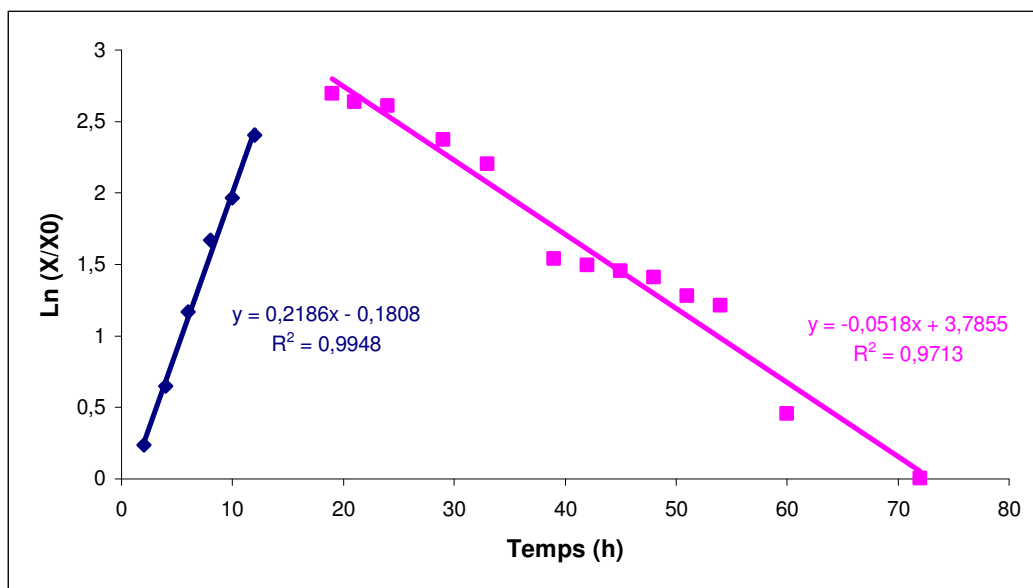


Figure III.3 : Evolution de la biomasse en échelle semi-logarithmique

Ces résultats indiquent que le milieu de culture et les méthodes de préparation de l'inoculum sont satisfaisants pour permettre un démarrage en phase exponentielle pratiquement sans véritable phase de latence. D'autres essais de ce type (résultats non reportés) ont permis d'étudier l'influence de la composition du milieu de culture et de montrer notamment que les acides gras introduits en faible quantité dans le milieu (solution d'AGV) et en particulier l'acide valérique, l'acide isobutyrique et le DL 2 méthylbutyrate étaient essentiels pour que la culture démarre.

Par ailleurs plusieurs essais ont montré qu'une rupture de l'anaérobiose pendant quelques instants au début des cultures était fatale.

2.2 Corrélation DO poids sec

En collectionnant des résultats issus de nombreuses expériences réalisées dans des conditions différentes et pour lesquelles nous avons mesuré simultanément le poids sec de biomasse et la DO à 600 nm, une droite d'étalonnage DO poids sec a été établie (Figure III.4). La corrélation établie est :

$X = 0,3772 \text{ DO}$ où X est la concentration en g L^{-1} et la DO est considérée à 600 nm.

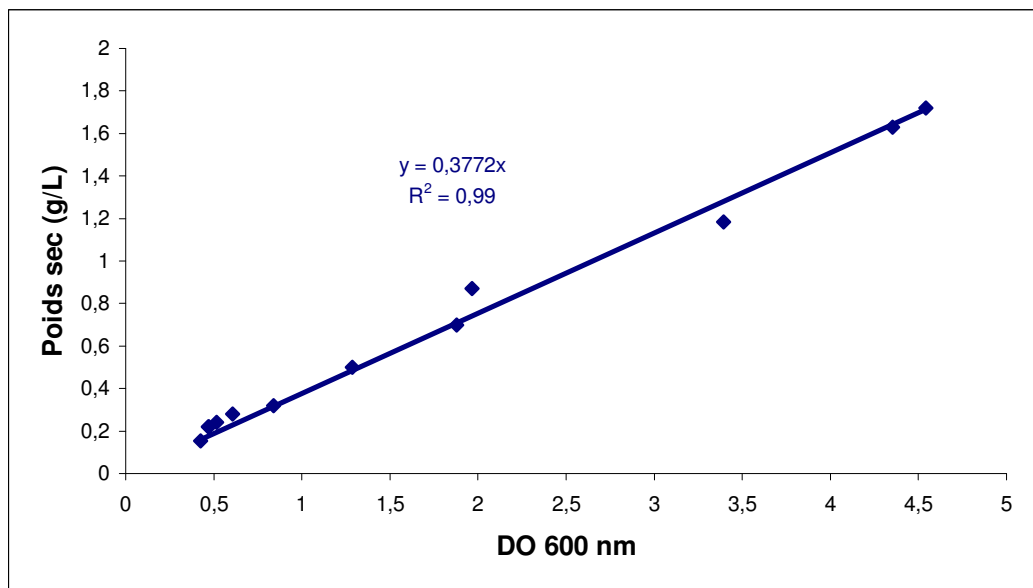


Figure III.4 : Droite d'étalonnage DO poids sec

3 ANALYSE D'UNE CULTURE SUR GLUCOSE EN BIOREACTEUR

Il s'agit ici d'analyser une culture de référence sur glucose afin de vérifier si les méthodes d'analyse et de suivi sont satisfaisantes et d'avoir une première idée des grandes orientations métaboliques de *F.s.*. Signalons qu'une étude de ce type, c'est-à-dire une culture sur glucose dans les conditions contrôlées d'un bioréacteur, n'a jamais été publiée à notre connaissance, les seules études accessibles concernent des croissances en tubes scellés du même type que les résultats qui ont été présentés précédemment.

Evidemment, nous ne pourrions pas pousser aussi loin l'analyse métabolique pour des cultures sur les substrats complexes mais cette première partie nous permet de caractériser un fonctionnement « normal » de *F.s.* sur un milieu synthétique complètement caractérisé.

3.1 Résultats expérimentaux pour une culture en batch sur glucose

L'expérience est réalisée dans le bioréacteur. La croissance cellulaire de *F.s.* a été mesurée par la densité optique à 600 nm et la production en métabolites par HPLC. La production de CO₂ a été mesurée par augmentation de la pression en suivant les protocoles qui ont été décrits au chapitre précédent. Le substrat est le glucose ; sa concentration initiale est de 8 g L⁻¹. La culture a été maintenue jusqu'à 110 h.

Compte tenu des risques de ré-aération du milieu de culture, le nombre des prélèvements sur la phase liquide a été minimisé de telle sorte que, sur l'expérience reportée sur les figures III.5 à III.6, il n'y a que deux prélèvements intermédiaires sur lesquels les concentrations en métabolites, substrats résiduels et biomasse ont été mesurées. En effet, les contraintes d'anaérobiose imposent que le réacteur ne soit ouvert que rarement afin de maintenir les conditions de pression, d'anaérobiose et de ne pas faire entrer de l'oxygène dans le système.

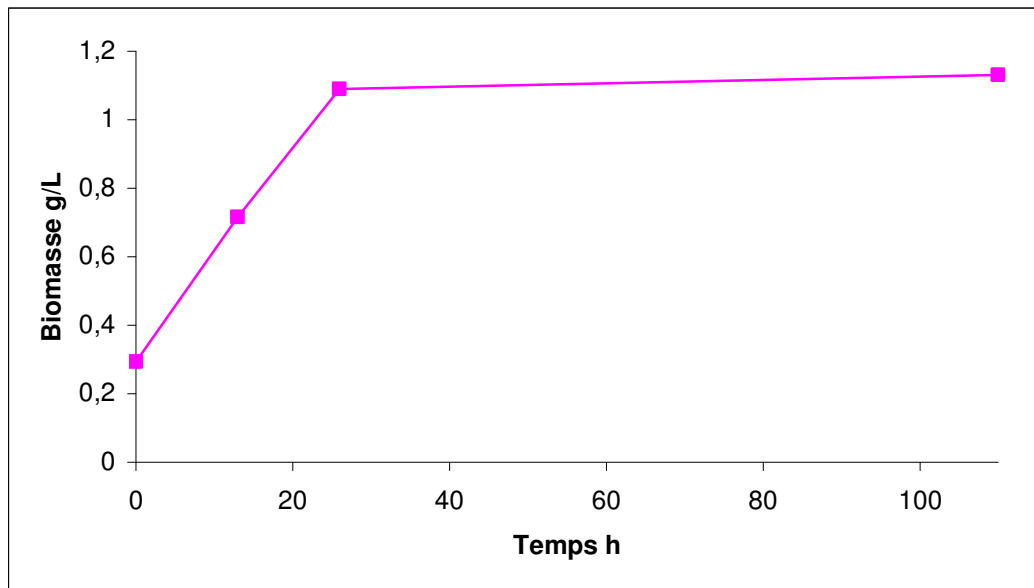


Figure III.5 : Evolution de la concentration en biomasse pour la culture de référence.

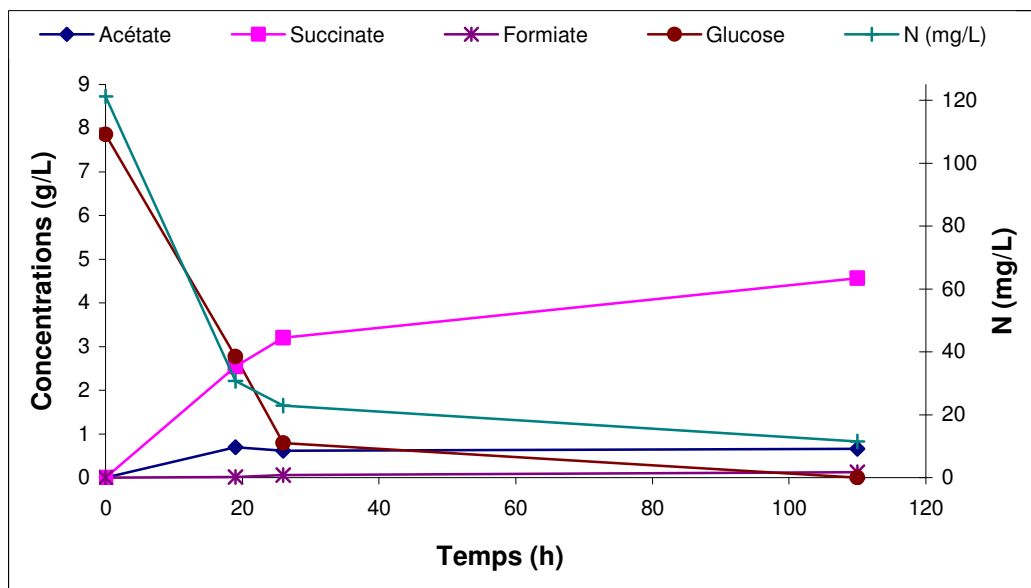


Figure III.6 : Evolution des concentrations en métabolites et en azote pour la culture de référence.

Par contre, la mesure du volume de gaz expulsé est réalisée en semi continu ainsi que le montre la figure III.7. C'est donc une mesure beaucoup plus riche en informations cinétiques

que les mesures sur la phase liquide. L'évolution du potentiel redox et du pH (régulé à 6,0) est reportée sur la figure III.8. Tous les résultats sont fournis dans les tableaux III.1 et III.2.

Temps (h)	Acétate (g)	Succinate (g)	Formiate (g)	Glucose (g)	N (mg)	Biomasse (g)
0	0	0	0	31,43	485,11	1,18
19	2,79	10,18	0,06	11,08	122,98	2,87
26	2,48	12,82	0,24	3,16	91,49	3,77
110	2,64	18,27	0,50	0,00	45,96	4,53

Tableau III.1 : Masse des métabolites, du glucose, de l'azote et de la biomasse dans le bioréacteur (volume utile 4 L) pour la culture de référence.

Temps (h)	CO ₂ (g)
0	0
19	3.35
20,5	3,61
26	5.75
32,9	8,43
41,8	9,63
50	9,63
80	9,63
110	9,63

Tableau III.2 : Masse de CO₂ produite pour la culture de référence.

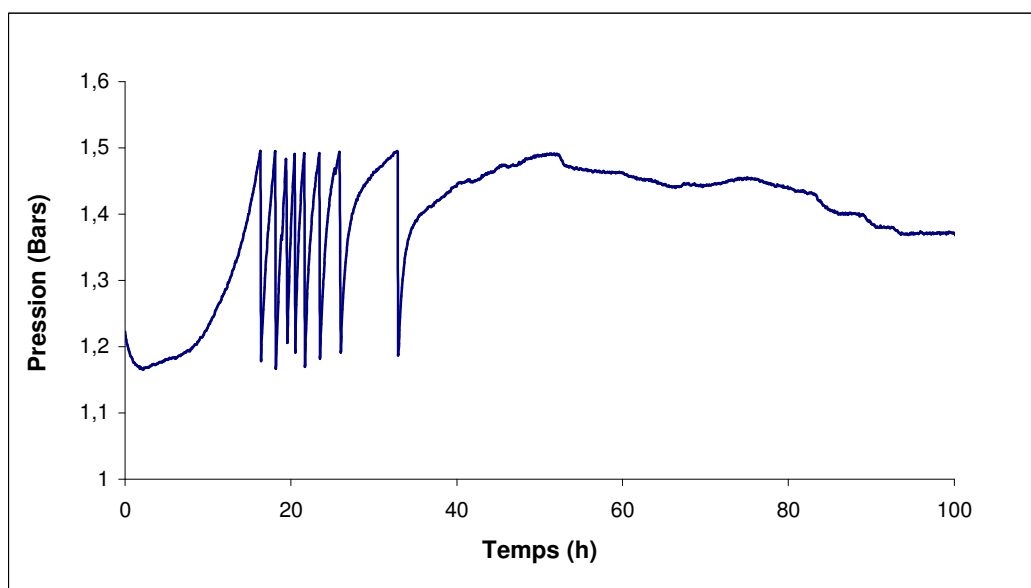


Figure III.7 : Evolution de la pression pour la culture de référence.

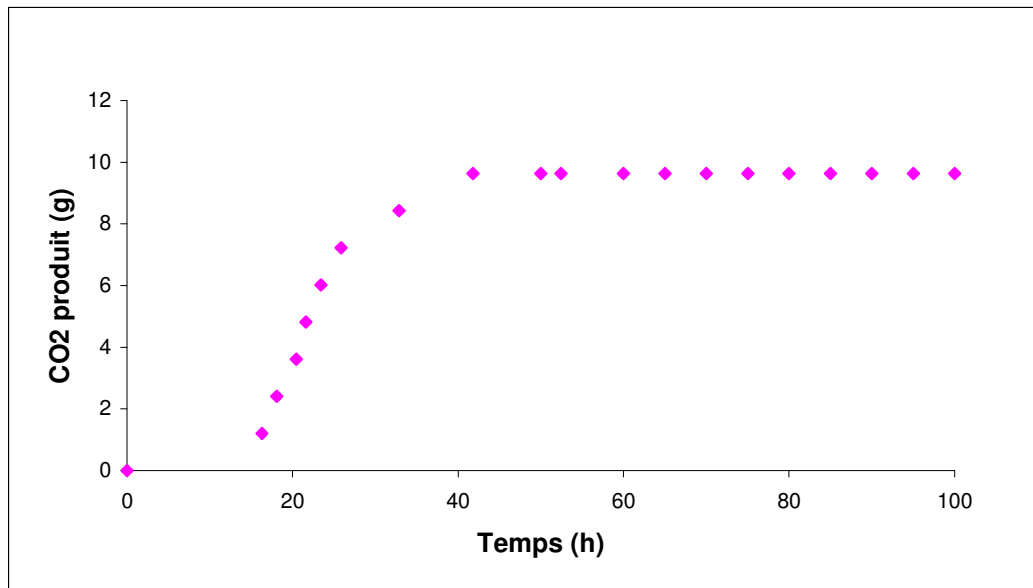


Figure III.8 : Evolution de la quantité de CO₂ produit pour la culture de référence.

On constate (Figures III.7 et III.8) que la culture comporte trois phases : une phase de croissance rapide (0 à 26 h), une phase de production de CO₂ à vitesse constante (26 h à 41 h) et une phase stationnaire jusqu'à l'arrêt de la culture. On n'observe pas, comme sur les expériences réalisées en fioles scellées (Figure III.2), de phase de mortalité cellulaire. On constate également que ni le glucose ni la source d'azote ne semblent être les substrats responsables de l'arrêt de la croissance cellulaire. Par contre dans la phase de production du CO₂ à vitesse constante, tout le glucose est épuisé.

Les seuls AGV produits sont le succinate, l'acétate et le formiate. Ils ne sont pas reconsommés après l'épuisement du substrat carboné puisque leurs concentrations sont identiques à 26 h de culture et à 110 h. Ils sont produits durant la phase de croissance et durant la phase de production de CO₂ à vitesse constante. Ce sont les trois métabolites caractéristiques de la croissance de *F. s.*.

La production de succinate observée dans les 20 premières heures se ralentit pour atteindre 4,58 g L⁻¹ en fin de culture. La production d'acétate suit la même évolution avec cependant une concentration plus faible, 0,66 g L⁻¹ en fin de culture. Enfin, la production de formiate en quantité plus faible est également observée (0,13 g de formiate L⁻¹).

La concentration initiale introduite en azote de 120 mg N L^{-1} , diminue au cours du temps pour atteindre 11 mg L^{-1} en fin de fermentation ce qui montre une utilisation par *Fibrobacter succinogenes* de l'azote présent dans la solution minérale II.

L'évolution du pH et du potentiel d'oxydo-réduction durant la fermentation (Figure III.9) montre que la production d'AGV induit la baisse du pH en début de culture jusqu'à la mise en route (après 12 h) du dispositif de contrôle qui commande l'ajout de Na_2CO_3 et qui se révèle efficace jusqu'à la fin de la culture. Le potentiel redox, qui n'est pas un paramètre régulé, reste constant jusqu'à la fin de la culture et égal à la valeur initiale de -351 mV .

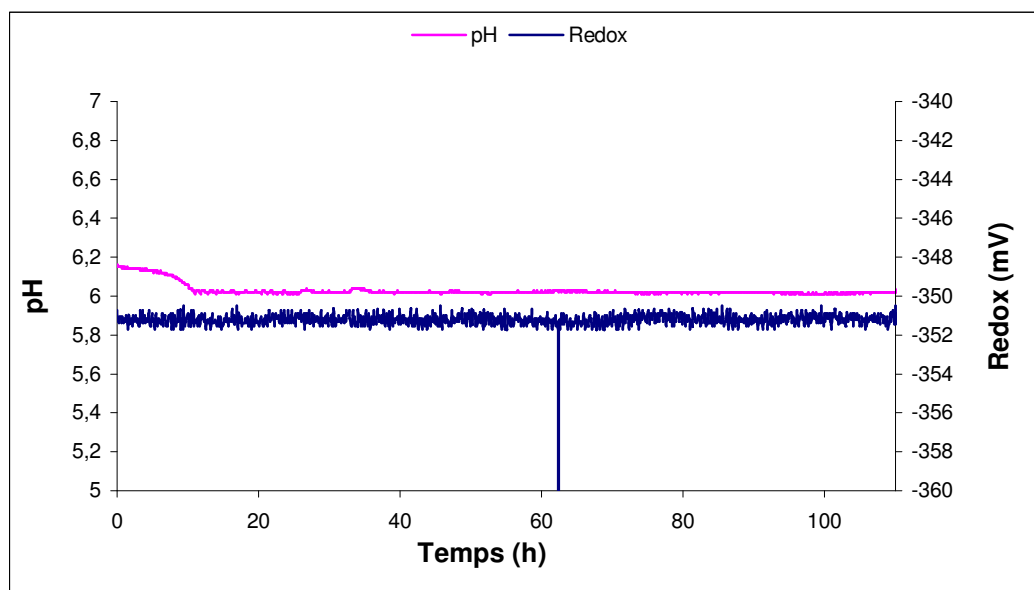


Figure III.9 : Evolution du pH et du potentiel d'oxydoréduction pour la culture de référence.

La croissance débute dès le début de la culture, ce qui se caractérise par une diminution du pH qui est due à l'activité de *F.s.*. La production des AGV est donc bien associée à la croissance, ce qui acidifie le milieu. L'impossibilité de multiplier les prélèvements sur la phase liquide empêche d'établir la courbe de croissance directement. A 26 h la concentration en biomasse ($1,09 \text{ g L}^{-1}$) est pratiquement identique à sa valeur en fin de culture ($1,13 \text{ g L}^{-1}$). La phase de létalité (décroissance de la concentration en biomasse probablement due à de la lyse cellulaire) observée sur tubes scellés n'est pas reproduite en bioréacteur où l'environnement chimique (pH, potentiel redox) est maintenu constant.

Les évolutions de la pression dans le réacteur au cours de la fermentation et de la quantité de CO_2 dégagé sont représentées sur la figure III.7. La pression est manuellement ajustée à 1,2 bars en début de culture puis diminue durant les premières heures du fait de l'équilibre chimique qui s'établit entre la phase gazeuse et la phase liquide. Le comptage du nombre d'ouvertures de l'électrovanne, qui expulse le CO_2 lorsque la pression interne est de 1,5 bars et la ramène à 1,15 bars, permet d'estimer la quantité de CO_2 produit au cours de la fermentation par récupération du gaz dans cloche (§ 2.2.1.3). Sur la durée de la fermentation (110 h), l'électrovanne s'est ouverte 8 fois donc 5,6 L de CO_2 ont été produits ce qui correspond à une augmentation de la pression en valeur cumulée de 4 bars et à une production de 9,63 g de CO_2 sur la totalité de la culture. La production de CO_2 augmente lentement dans un premier temps puis de façon beaucoup plus rapide jusqu'à 25 h. De 25 à 40 h, l'augmentation de pression est linéaire. Il semble que la fermentation du glucose entraîne une augmentation importante de la production en CO_2 pendant les 25 premières heures ce qui correspond à la même période de diminution de pH. A partir de 40 h de culture, la production de CO_2 est quasiment nulle. La production de CO_2 suit donc la même évolution que les productions en métabolites : une augmentation importante qui semble comporter deux phases puis une stabilisation.

La composition du gaz a été mesurée par chromatographie en phase gazeuse et ces analyses révèlent que le gaz est composé à 98% de CO_2 .

3.2 Analyse des bilans matière

Pour valider le procédé et les méthodes d'analyse et de suivi qui seront utilisées dans la suite de l'étude, l'analyse des bilans carbone et azote a été réalisée sur la culture de référence sur glucose. Il s'agit ici de déterminer si ce qui a été introduit dans le réacteur au cours de l'expérimentation est bien retrouvé en fin de fermentation (Tableaux III.3 et III.4).

Nous travaillons en masse totale des produits et des éléments dans le réacteur (dont le volume de culture est de 4 L utiles) et non pas en concentrations. La raison est que la mesure du CO_2

produit est une mesure de quantité totale produite, de même que dans la suite de l'étude, les quantités de végétaux introduites seront déterminées en masses totales.

Substrats	Total ajouté (g MS)	%C	Total C (g)	Total ajouté (g MS)	%N	Total N (g)
Glucose	32	40	12,8	32	0	0
Carbonate	13,2	11,3	1,5			
N-NH3				0,5	0,8	0,4

Tableau III.3 : Composition en carbone et en azote des entrées (substrats).

AGV	Quantité finale g	%C	Total C (g)	%N	Total N (g)
Acétate	2,6	39,95	1		
Succinate	18,3	40,65	7,5		
Formiate	0,5	39,96	0,2		
Glucose	0	40	0		
CO ₂	10,3	27,27	2,8		
Biomasse	4,5	44,5	2,01	6,8	0,3
N-NH3	0,06			80	0,05

Tableau III.4 : Composition en carbone et en azote en fin de culture et des produits en sortie.

La seule autre source de carbone que le glucose introduite dans le milieu de culture est le carbonate (Na₂CO₃) utilisé pour la régulation du pH au cours de la culture. Les quantités totales ajoutées sont de 13,2 g pour le carbonate et 32 g pour le glucose. 21,4 g d'AGV et 4,5g de biomasse ont été produits. La vérification du taux de recouvrement de l'azote et du carbone est reportée dans les tableaux III.5 et III.6.

	Entrées		Sorties			
Source	Substrat	Carbonate	Résidus	AGV	CO ₂	Biomasse
Total C (g)	12,8	1,5	0	8,7	2,8	2,01
Total C (g)	14,3		13,5			
Bilan %	94,5%					

Tableau III.5 : Vérification du bilan carbone sur la culture de référence.

	Entrées		Sorties		
Source	Substrat	N-NH ₃	Résidus	N-NH ₃	Biomasse
Total N (g)	0	0,38	0	0,05	0,31
Total N (g)	0,38		0,36		
Bilan %	95%				

Tableau III.6 : Vérification du bilan azote sur la culture de référence.

Les taux de recouvrement du carbone et de l'azote sont de l'ordre de 95% ce qui montre la validité des contrôles et des mesures effectués. Ces bilans montrent que 61,8 % du carbone a été converti en AGV, 19,9 % en CO₂ et 14,3 % en biomasse ; de même 81,6 % de l'azote introduit a été utilisé pour former les constituants cellulaires de la biomasse.

Ces résultats confirment par ailleurs que la formule C-molaire de la biomasse qui a été estimée C H_{1,59} O_{0,40} N_{0,20} (Tableau II.2) est satisfaisante et qu'elle conduit à des valeurs correctes pour les taux de recouvrement du carbone et de l'azote. L'analyse de la sensibilité des paramètres concernant la précision de cette composition cellulaire montre par ailleurs que l'influence sur les bilans globaux est peu importante.

3.3 Analyse stoechiométrique de la culture de référence sur glucose

Pour l'instant l'analyse des bilans matière sur le carbone et l'azote permet de vérifier que globalement les méthodes de suivi sont satisfaisantes. Il convient cependant de traduire ceci en termes stoechiométriques ce qui doit permettre aussi de décrire les bilans sur les autres éléments O et H.

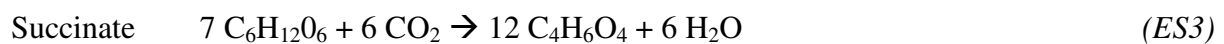
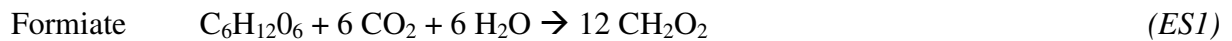
L'analyse des courbes de production de CO₂ montre que deux phases peuvent être distinguées : une phase de croissance cellulaire et une phase de production de CO₂ à vitesse constante que nous appellerons « phase de maintenance ». Ceci doit donc correspondre à deux analyses stoechiométriques distinctes.

La phase de maintenance étant la plus simple à étudier nous commençons l'analyse stoechiométrique par celle-ci.

3.3.1 Analyse stœchiométrique de la phase de maintenance

Durant cette phase, les substrats carbonés (glucose et carbonate) sont consommés, du CO₂ est produit en même temps que les 3 AGV : succinate, acétate et formiate.

En considérant les formules des AGV produits et sans se préoccuper des voies métaboliques de conversion du substrat (glucose) en produits (AGV), on peut écrire *a priori*, en bouclant les équations de conservation des éléments C H et O, les trois équations stoechiométriques correspondantes :



Ce qui frappe dans cette écriture est que le CO₂ est consommé et non pas produit, quelle que soit la combinaison que l'on fasse entre ces équations.

Pour comprendre pourquoi on observe globalement une production de CO₂, il est nécessaire de prendre en considération le fait que ce ne sont pas les formes protonées des AGV qui sont produites mais les formes chargées.

Pour que l'électroneutralité de la solution soit satisfaite, il faut donc que des cations soient introduits. C'est ce qui se passe lorsque la solution de Na₂CO₃ est ajoutée pour maintenir le pH à la valeur de 6.

Cette question est en fait un peu plus complexe qu'il n'y paraît. Pour l'acétate et le formiate les pK sont respectivement de 4,8 et de 3,8. A pH 6, les seules formes existantes en solution sont les anions chargés 1⁻. Pour le succinate, les deux constantes de dissociation ont des pK de 4,2 et 5,6. A pH 6, la résolution des équilibres de dissociation montre qu'il existe dans une solution idéale 71 % de forme 2⁻ et 29 % de forme 1⁻, sachant aussi que ces proportions peuvent être modifiées par le fait que le milieu de culture n'est pas véritablement une solution idéale et que de plus le succinate sous forme anionique peut être complexé par plusieurs cations divalents dont le Mg²⁺ qui est présent en solution.

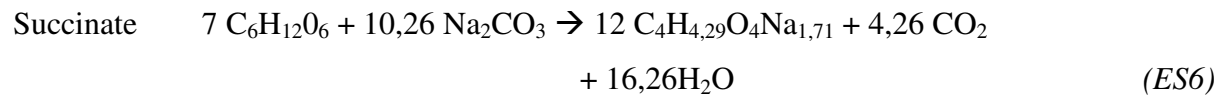
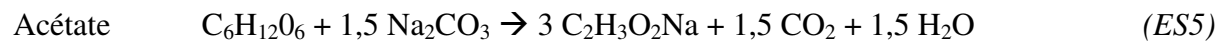
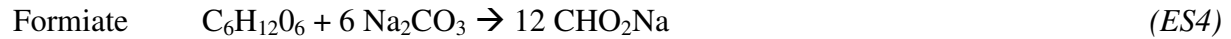
Ces réserves mises à part, les formules molaires des AGV dans le milieu de culture sont donc en première approximation :

Formiate : $\text{C H O}_2 \text{ Na}$

Acétate : $\text{C}_2 \text{ H}_3 \text{ O}_2 \text{ Na}$

Succinate : $\text{C}_4 \text{ H}_{4,29} \text{ O}_4 \text{ Na}_{1,71}$

Les équations stoechiométriques précédentes doivent donc être ré-écrites comme suit en prenant en considération la conservation de C, H, O et Na.



On comprend alors pourquoi sous cette forme la production de CO_2 est associée à la formation des trois AGV.

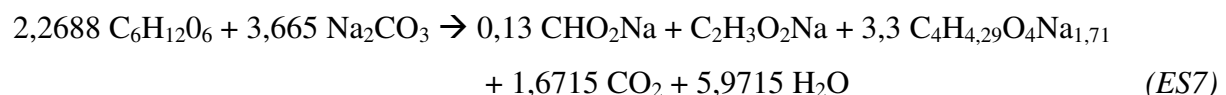
Pour obtenir une équation stoechiométrique caractéristique de la maintenance cellulaire, il est nécessaire de prendre en compte la proportion des trois acides synthétisés. Nos résultats montrent que les trois acides sont synthétisés suivant un rapport à peu près constant, soit en molaire et dans l'ordre succinate / acétate / formiate : 3,3 / 1 / 0,13. Ce résultat est tout à fait conforme aux proportions obtenues par Matheron (1997) (3,7 / 1 / 0,3) pour des études complètement différentes sur le métabolisme de *F.s.* dans des tubes de RMN visant l'étude de la répartition du carbone marqué sur les différentes voies métaboliques.

Pour obtenir une équation stoechiométrique caractéristique de la maintenance cellulaire il ne reste donc plus qu'à faire la somme pondérée des équations ES 4 à ES 6 et de ramener à 1 mole de glucose, ce qui donne :

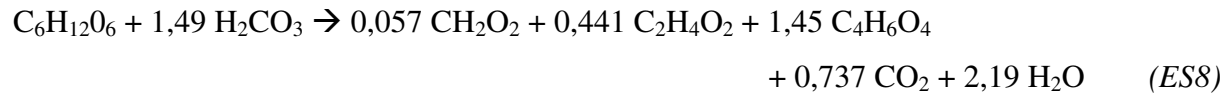
Maintenance cellulaire :

$$\text{ES 7} = 0,13 / 12 * \text{ES 4} + 1 / 3 * \text{ES 5} + 3,3 / 12 * \text{ES 6}$$

soit :



Et en ramenant à 1 mole de glucose et en ré-introduisant les formes protonées, on obtient :



L'équation précédente caractérise donc la maintenance. Elle fait intervenir 7 composés donc 7 coefficients stoechiométriques. 3 bilans C, H et O et un bilan caché qui est le bilan sur Na ont été utilisés. 1 coefficient a été fixé à 1, celui du glucose. Pour résoudre, deux rendements de production, Succinate / Acétate et Formiate / Acétate, ont été utilisés.

Les rendements massiques de conversion associés à cette relation sont calculés dans le Tableau III.7.

	Acétate	Succinate	Formiate	Glucose	CO ₂
Rendements massiques g.g glucose⁻¹	0,147	0,951	0,015	1,000	0,180

Tableau III.7 : Rendements massiques de conversion associés à la relation ES 8.

De façon très macroscopique, l'équation ES 8 indique donc que le CO₂ dégagé par la maintenance de *F.s.* provient de l'introduction dans le milieu de carbonate de sodium à des fins de régulation du pH. Le bilan est même déficitaire puisque l'on obtient $0,727 / 1,51 = 0,48$ moles de CO₂ dégagé par mole de carbonate introduit ; l'étude précédente montre que ce rapport dépend du pH de régulation puisque la fraction de succinate sous forme divalente en dépend.

Dans l'écosystème rumen, la production de succinate par *F.s.* résulte de la même façon de la pression partielle de CO₂ qui est forte dans l'estomac et qui est produit par les autres espèces d'organismes présents (en particulier les méthanogènes). Nous avons d'ailleurs constaté que le démarrage de la souche de *F.s.* en réacteur ne pouvait avoir lieu qu'à la condition que le système soit porté sous une pression de CO₂ d'au moins 1,2 bars.

Sans entrer dans le détail du métabolisme de *F.s.* et de son énergétique, la production de succinate est associée au fonctionnement de la fumarate réductase (Gottschalk, 1986 ; Matheron, 1997) dont le potentiel redox est d'environ ($2\text{H}^+ + \text{fumarate} \rightarrow \text{succinate}$) $E'_0 = + 30 \text{ mV}$. La fumarate réductase est liée à la membrane cellulaire et le saut de potentiel avec la déshydrogénase ($\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ ; E'_0 = - 420 \text{ mV}$) ou la formiate déshydrogénase ($\text{HCOOC} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ ; E'_0 = - 200 \text{ mV}$) est suffisant pour coupler avec l'ATP synthase. C'est même probablement la voie principale de synthèse de l'ATP par phosphorylation non associée au substrat. La synthèse de succinate est donc directement associée à l'énergétique cellulaire et à la synthèse de l'ATP.

C'est la raison pour laquelle le succinate est autant un métabolite que l'on retrouve en maintenance cellulaire que de façon associée à la croissance cellulaire (métabolite primaire). Une analyse plus fine du métabolisme cellulaire devrait permettre de comprendre comment les rapports Succinate / Acétate et Succinate / Formiate se fixent aux valeurs qui ont été observées.

3.3.2 Analyse stœchiométrique de la croissance cellulaire

Par rapport à l'analyse précédente, la croissance cellulaire fait intervenir deux « composés » de plus : les constituants cellulaires ($\text{C}_{1,59} \text{H}_{1,59} \text{O}_{0,40} \text{N}_{0,20}$) et la source d'azote considérée ici comme NH_3 . Il faut donc un rendement supplémentaire pour équilibrer une équation stœchiométrique.

A partir des informations expérimentales dont nous disposons dans l'expérience reportée sur les figures III.6 à III.8, nous n'avons pas suffisamment de données pour établir cette équation. Ceci sera réalisé directement à partir du programme de simulation.

3.4 Analyse cinétique de la phase de croissance et de la phase de maintenance

3.4.1 Analyse cinétique de la phase de maintenance

L'analyse cinétique de la phase de maintenance est assez simple. Il suffit de mesurer par régression linéaire la vitesse de production de CO₂ après l'arrêt de la croissance et avant l'épuisement du glucose, soit entre 25 et 50 h (Figure III.8).

La mesure conduit à une vitesse de 0,150 g CO₂ h⁻¹ soit en vitesse ramenée à la concentration cellulaire 0,034 g CO₂ gX⁻¹ h⁻¹. En utilisant ES 8, on obtient une vitesse de maintenance cellulaire exprimée par rapport au glucose de 0,19 g glucose gX⁻¹ h⁻¹.

3.4.2 Analyse cinétique de la phase de croissance

Nous décrivons ici une phase de croissance supposée exponentielle non limitée par les substrats, soit :

$$\frac{dX}{dt} = r_X = \mu_{\max} X \quad (E1)$$

Comme ceci a déjà été mentionné, seule la cinétique de production de CO₂ mesurée en bioréacteur peut être utilisée pour déterminer la vitesse de croissance cellulaire. Cette vitesse r_{CO_2} est la résultante de la production associée à la croissance et de la production associée à la maintenance des cellules formées, soit :

$$\begin{aligned} r_{CO_2} &= r_{CO_2 \text{ maintenance}} + r_{CO_2 \text{ croissance}} \\ r_{CO_2} &= \alpha X + Y r_X = (\alpha + Y \mu_{\max}) X \end{aligned} \quad (E2)$$

D'après ce qui précède, la variable α vaut 0,034 g CO₂ gX⁻¹ h⁻¹. Y est le rendement massique de production de CO₂ par rapport à la biomasse. En introduisant la vitesse r_X , on obtient :

$$r_{CO_2} = \left(\frac{\alpha}{\mu_{\max}} + Y \right) r_X \quad (E3)$$

Après intégration, on obtient donc :

$$\Delta CO_2 = \left(\frac{\alpha}{\mu_{\max}} + Y \right) \Delta X V \quad (E4)$$

Où V désigne le volume de liquide dans le réacteur et ΔCO_2 et $\Delta X.V$ désignent les quantités de CO_2 et de biomasse synthétisées pendant un temps Δt .

Par ailleurs l'intégration de l'équation de croissance donne :

$$\ln \frac{X}{X_0} = \ln \left(1 + \frac{\Delta X}{X_0} \right) = \mu_{\max} t \quad (E5)$$

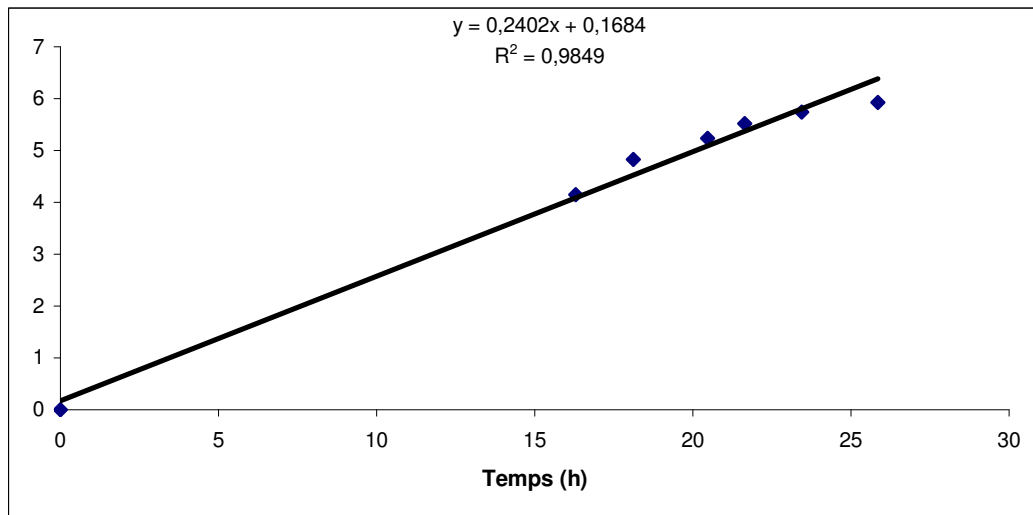
Ce qui, en éliminant la concentration en biomasse X, donne :

$$\ln \left(1 + \frac{\Delta CO_2}{V X_0 \left(\frac{\alpha}{\mu_{\max}} + Y \right)} \right) = \mu_{\max} t \quad (E6)$$

Donc, en portant le terme du membre de gauche en fonction du temps, on obtient le taux de croissance par régression linéaire. Ceci est reporté sur la figure III.10 et conduit à :

$$\mu_{\max} = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

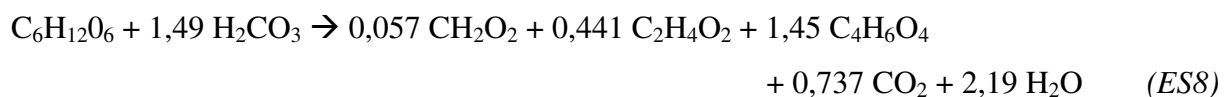
Cette valeur est tout à fait en accord avec la première estimation du taux de croissance maximum sur tubes scellés. Ceci montre que l'analyse précédente, même si elle est simpliste, fournit des résultats cohérents.

Figure III.10 : détermination du μ_{\max} .

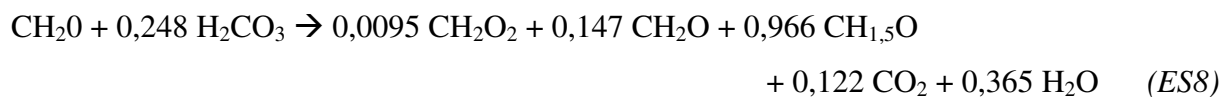
3.5 Simulation

L'ensemble des résultats précédents est repris dans le programme de simulation décrit au chapitre précédent.

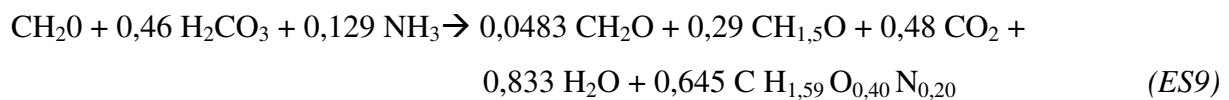
Nous avons donc deux équations stoechiométriques associées à la culture présentée. La première est l'équation de maintenance déterminée dans le paragraphe 3.3.1 :



Soit en ramenant à 1 C-mole de glucose :



La deuxième équation stœchiométrique est identifiée directement à partir du programme de simulation. Le résultat est le suivant :



Ces deux équations nous permettent d'obtenir les simulations présentées sur les figures III.11A et B en considérant que pour la maintenance la vitesse de consommation du glucose est de $0,19 \text{ g glucose gX}^{-1} \text{ h}^{-1}$, que le taux de croissance maximum est $\mu_{\max} = 0,24 \text{ h}^{-1}$ et que l'arrêt de la croissance est provoqué par l'épuisement de la source d'azote sous forme d'un terme de limitation de type équation de Monod. L'arrêt de la production est aussi simulé par un terme de type Monod par rapport au glucose.

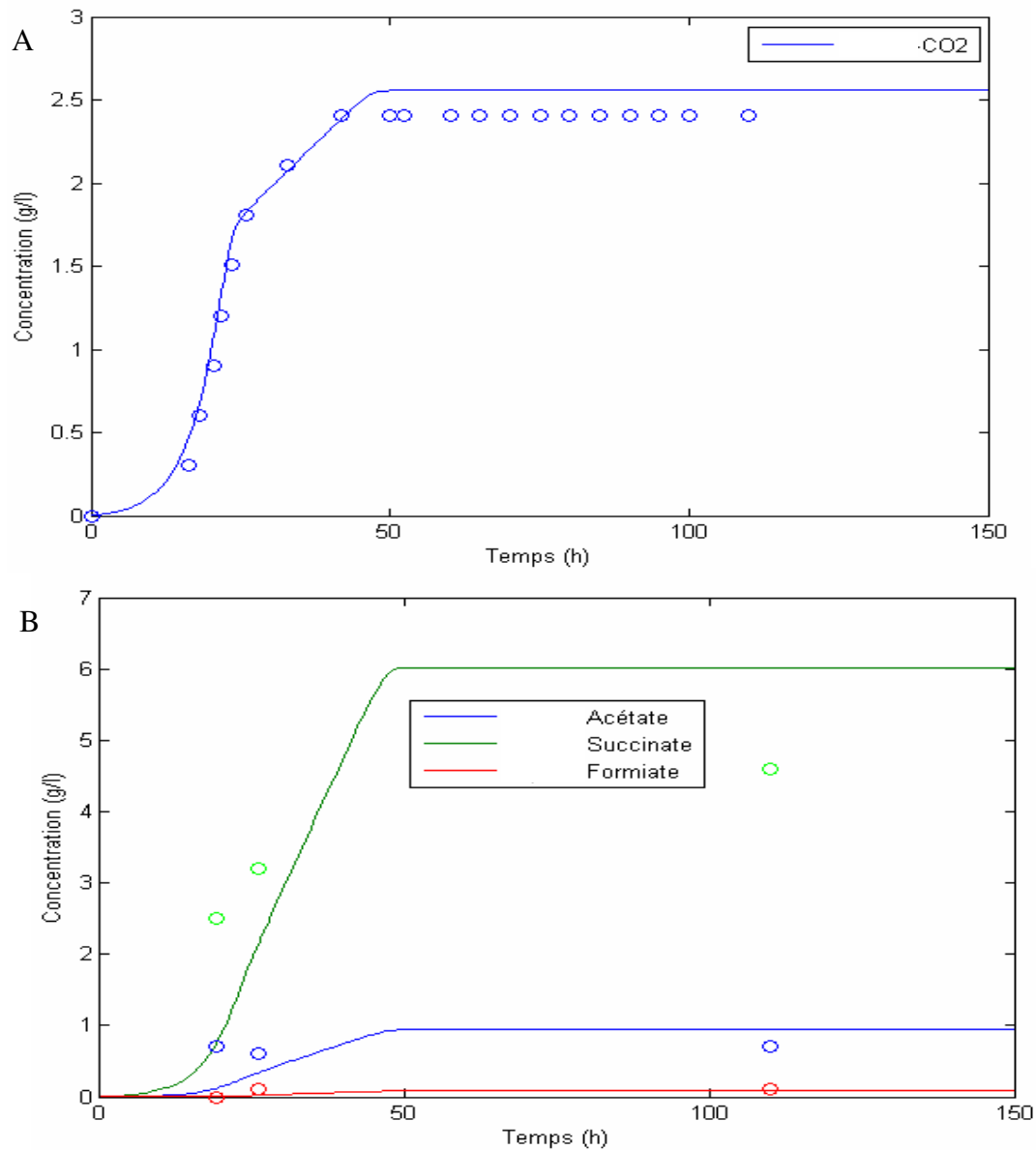


Figure III.11 : Evolution des concentrations, — : par la simulation, o ; par l'expérience ; A : Evolution de la concentration en CO_2 , B : Evolution de la concentration en métabolites.

Les concentrations simulées sont assez proches de celles obtenues par l'expérimentation sauf pour le succinate dont la concentration mesurée expérimentalement est plus faible (10 %).

3.6 Discussion

Le but de ce paragraphe était de vérifier si les méthodes d'analyse et de suivi utilisées pour une culture sur glucose de *Fibrobacter succinogenes* en bioréacteur étaient satisfaisantes afin de pouvoir effectuer des cultures sur des végétaux avec ce procédé.

Les résultats obtenus montrent dans un premier temps qu'en bioréacteur *F.s.* produit les métabolites classiquement retrouvés dans la littérature : succinate, acétate, formiate et CO₂ (Bryant et Burkey, 1953 ; Scheifinger et Wolin, 1973 ; Steward et Flint, 1989 ; Weimer, 1993). De plus, l'évolution du pH et du potentiel d'oxydo-réduction montre également que les conditions optimales pour la croissance de *F.s.* ont été respectées. Enfin, l'analyse des bilans matières confirme la validité des méthodes d'analyse et de suivi utilisées pour cette culture.

Dans un deuxième temps, les résultats obtenus ont permis une analyse de la stœchiométrie de la culture de référence sur glucose. En effet, l'analyse de la production en CO₂ indique deux phases : une phase de croissance et une phase de maintenance. Ceci permet donc de caractériser la culture par deux stœchiométries différentes.

L'analyse de la phase que nous avons nommée « phase de maintenance » a conduit à représenter de façon cohérente la production des AGV et du CO₂. Deux conclusions principales ont été tirées : (i) la production de CO₂ résulte de l'ajout de bicarbonate dans le milieu pour maintenir le pH à la valeur de consigne (6,0) ; (ii) la production des AGV est directement liée à l'énergétique cellulaire et à la régénération de l'ATP

L'analyse de la phase de croissance conduit à déterminer un taux de croissance maximum relativement élevé pour une bactérie anaérobie ($\mu_{\max} = 0,24 \text{ h}^{-1}$). La détermination de la stœchiométrie de la croissance, qui est intrinsèquement liée à la stœchiométrie de la

maintenance, a été réalisée par ajustement à partir du programme de simulation « Anaerobic Waste Compartment Modelling and Simulation » mis au point au LGCB.

Les résultats obtenus permettent de dresser le tableau des rendements de conversion du glucose et d'utilisation des substrats et du carbonate pour les deux phases. Ceci est reporté dans le tableau III.8 où l'on a distingué la croissance cellulaire stricte (ES 9) et la croissance cellulaire à la vitesse maximale $\mu_{\max} = 0,24 \text{ h}^{-1}$ telle qu'on l'observe, couplée à la maintenance cellulaire (ES 8 et ES 9). Les deux dernières lignes du tableau III. 8 définissent donc les intervalles de variation des rendements entre une croissance à la vitesse maximale et un état où les cellules sont en maintenance stricte.

	Glucose	Acétate	Succinate	Formiate	CO ₂	Na-carbonate	Biomasse
Croissance pure (ES9)	1	0,048	0,285	0	0,704	1,350	0,490
Maintenance (ES8)	1	0,147	0,95	0,015	0,179	0,728	0
Croissance observable au taux de croissance maximal μ_{\max}	1	0,076	0,471	0,004	0,711	1,176	0,353

Tableau III.8 : Rendements massiques de conversion par rapport au glucose (g.gglucose⁻¹) pour la culture de référence.

La dernière ligne du tableau précédent a été obtenue en considérant que la vitesse de consommation ou de production d'un composé Z résultait de la somme des vitesses pour les 2 stoechiométries, soit :

$$r_Z = Y_{Z \text{ g maintenance}} m_g X + Y_{Z \text{ X synthèse}} r_X \quad (\text{E7})$$

Où $Y_{Z \text{ g maintenance}}$ et $Y_{Z \text{ X synthèse}}$ désignent les rendements massiques de conversion pour les équations stoechiométriques ES 8 et ES 9 et m_g désigne la vitesse spécifique de consommation du glucose par la maintenance. Avec $r_x = \mu_{\max} X$, on obtient :

$$r_Z = \left(Y_{Z \text{ g maintenance}} \frac{m_g}{\mu_{\max}} + \frac{Y_{Z \text{ g synthèse}}}{Y_{X \text{ g synthèse}}} \right) r_X \quad (\text{E8})$$

Les rendements de conversion par rapport à la biomasse Y_{ZX} sont donc donnés par :

$$Y_{ZX} = Y_{Zg \text{ maintenance}} \frac{m_g}{\mu_{\max}} + \frac{Y_{Zg \text{ synthèse}}}{Y_{Xg \text{ synthèse}}} \quad (\text{E9})$$

En particulier, le rendement relatif au glucose vaut :

$$Y_{gX} = \frac{m_g}{\mu_{\max}} + \frac{1}{Y_{Xg \text{ synthèse}}} \quad (\text{E10})$$

Avec $m_g = 0,19 \text{ g glucose gX}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $\mu_{\max} = 0,24 \text{ h}^{-1}$, $Y_{Xg \text{ synthèse}} = 0,49 \text{ gX g glucose}^{-1}$, on obtient $Y_{gX} = 2,832 \text{ g glucose gX}^{-1}$, soit $Y_{Xg} = 0,353 \text{ gX g glucose}^{-1}$.

Les rendements par rapport au glucose reportés dans le tableau III. 8 sont alors calculés par :

$$Y_{Zg} = Y_{ZX} \times Y_{Xg} \quad (\text{E11})$$

Cette analyse indique donc que la culture de *F.s.* peut être complètement représentée par une approche stœchiométrique associée à une analyse cinétique. Nous nous limiterons à cette approche, considérant que l'objectif recherché est atteint, sachant aussi qu'une analyse plus complète est possible à condition (i) de disposer d'informations expérimentales plus complètes en cours de culture (notamment un suivi de la concentration biomasse), (ii) de poursuivre l'analyse de la stœchiométrie à partir de l'étude du métabolisme, en particulier du métabolisme énergétique, qui seul peut rendre compte de la production de succinate ; cette dernière approche doit déboucher sur une analyse structurée au niveau métabolique avec un calcul de flux métaboliques.

4 ANALYSE DE DEUX CULTURES EN FED-BATCH TYPIQUES D'UN COMPORTEMENT NON AXENIQUE

4.1 Réacteur 1

4.1.1 Analyse des résultats expérimentaux

Dans l'exemple qui suit, le glucose a été ajouté en fed-batch avec deux apports de glucose de même quantité pour atteindre une concentration finale de 10 g.L^{-1} . Le temps de fermentation est de 140 h. Les mêmes variables que précédemment ont été suivies.

Jusqu'à 20 h de culture, les résultats sont très comparables aux résultats de la culture de référence. La croissance cellulaire (Figure III.12) est maximale après 32 h de culture. Cette phase de croissance est suivie d'une diminution de la concentration cellulaire jusqu'à l'ajout du glucose à 50 h puis par une stabilisation jusqu'à la fin de la fermentation. Les concentrations en AGV (Figure III.13) suivent aussi le même profil mais l'ajout de glucose à 50 h n'induit aucune nouvelle synthèse. La production de succinate observée dans les premières heures de culture atteint $3,41 \text{ g.L}^{-1}$ en 32 h. Le profil de production d'acétate est le même que celui du succinate mais avec des quantités produites moins importantes ($0,88 \text{ g.L}^{-1}$ en 32 h). La concentration en azote décroît pendant la première phase comme pour la culture en batch. L'apport d'azote dans la solution de glucose (le glucose est ajouté sous forme dissoute dans la solution minérale II qui contient de l'azote) ne semble induire aucune nouvelle croissance de *F.s.* (Figure III. 12).

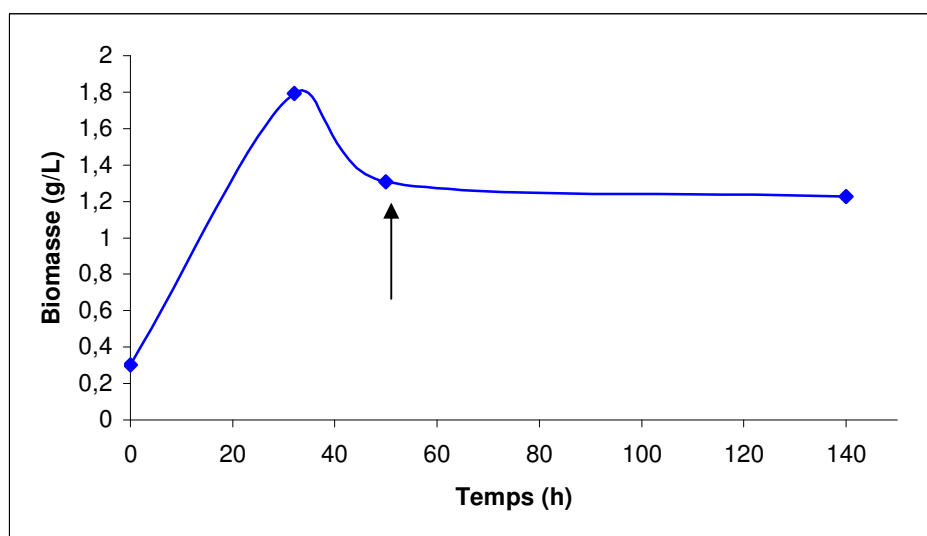


Figure III.12 : Evolution de la biomasse pour le réacteur 1 → : Ajout de glucose.

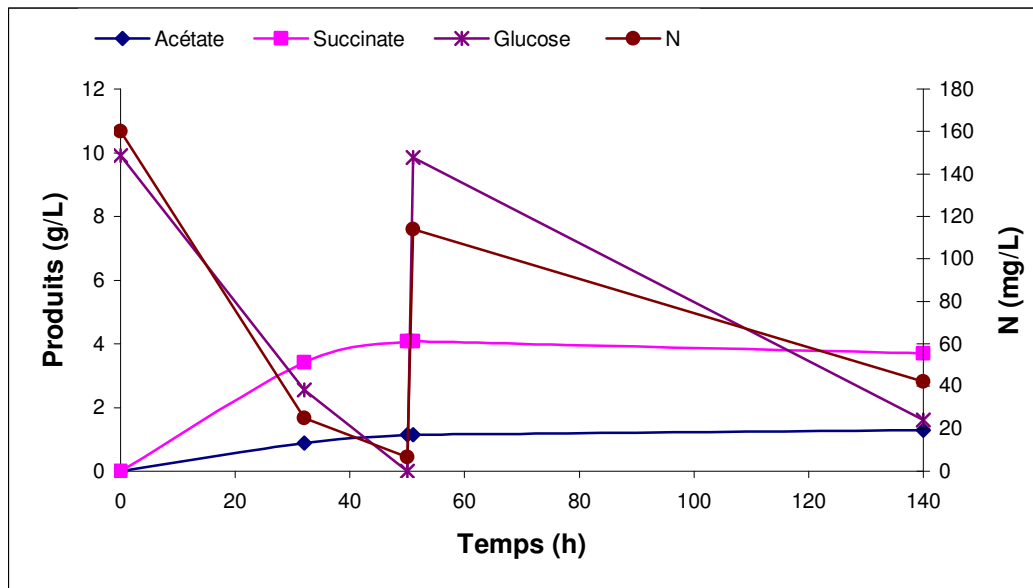


Figure III.13 : Evolution des concentrations en métabolites et en azote pour le réacteur 1.

Le profil d'évolution des concentrations est en relation avec la consommation du glucose et de l'azote. Trois phases peuvent être distinguées : une phase rapide de 0 h à 32 h durant laquelle en vitesse moyenne $0,91 \text{ g.h}^{-1}$ de glucose et 15 mg.h^{-1} d'azote sont consommés et $0,11 \text{ g.h}^{-1}$ d'acétate et $0,43 \text{ g.h}^{-1}$ de succinate sont produits ; une phase de ralentissement de 32 h à 50 h où en vitesse moyenne $0,57 \text{ g.h}^{-1}$ de glucose et $4,04 \text{ mg.h}^{-1}$ d'azote sont consommés et $0,06 \text{ g.h}^{-1}$ d'acétate et $0,15 \text{ g.h}^{-1}$ de succinate sont produits et une phase de diminution à partir de 50 h où $0,37 \text{ g.h}^{-1}$ de glucose, $3,15 \text{ mg.h}^{-1}$ d'azote et $0,017 \text{ g.h}^{-1}$ de succinate sont consommés et $0,006 \text{ g.h}^{-1}$ d'acétate est produit.

Le profil d'évolution du CO_2 produit est fourni sur la figure (Figures III.14 et III.15). Sur la durée de la fermentation, c'est-à-dire 140 h, 37,8 L de CO_2 ont été produits ce qui donne une quantité cumulée de CO_2 de 65 g. Le suivi de la pression indique que le profil de production est pratiquement identique à celui obtenu pour la culture de référence (Figures III.7 et III.8) jusqu'à environ 15 h – 18 h de culture, après quoi la vitesse de production se stabilise à une valeur pratiquement constante ($0,72 \text{ g h}^{-1}$) beaucoup plus importante que la vitesse obtenue pour la culture de référence ($0,15 \text{ g h}^{-1}$) alors que la concentration en biomasse est pratiquement identique. L'épuisement du glucose après 48 h de culture induit l'arrêt de la

production de CO_2 . Après l'ajout du glucose à 50 h, la production reprend, après un temps d'adaptation d'environ 20 h, à la même vitesse constante d'environ $0,72 \text{ g h}^{-1}$.

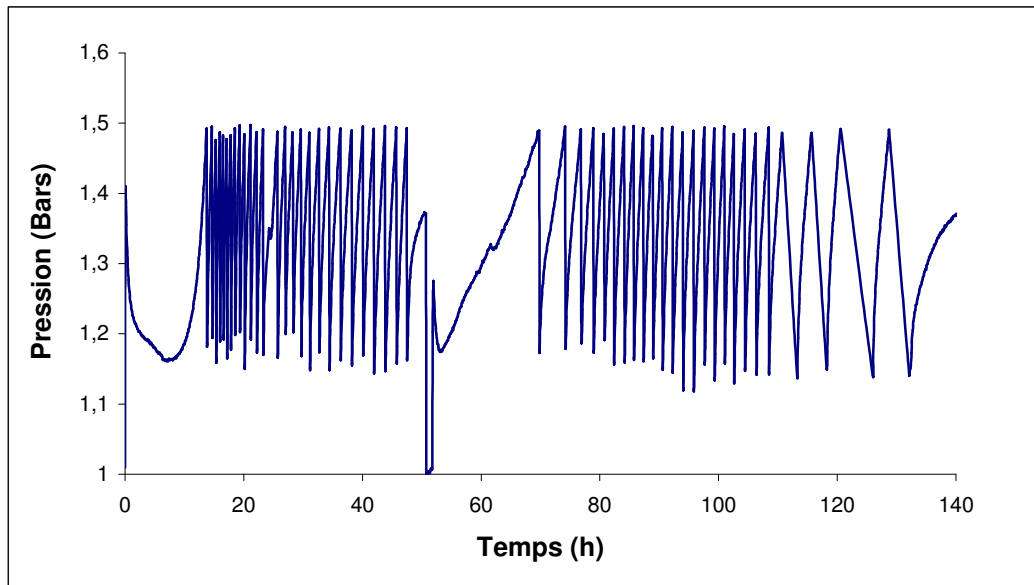


Figure III.14 : Evolution de la pression pour le réacteur 1.

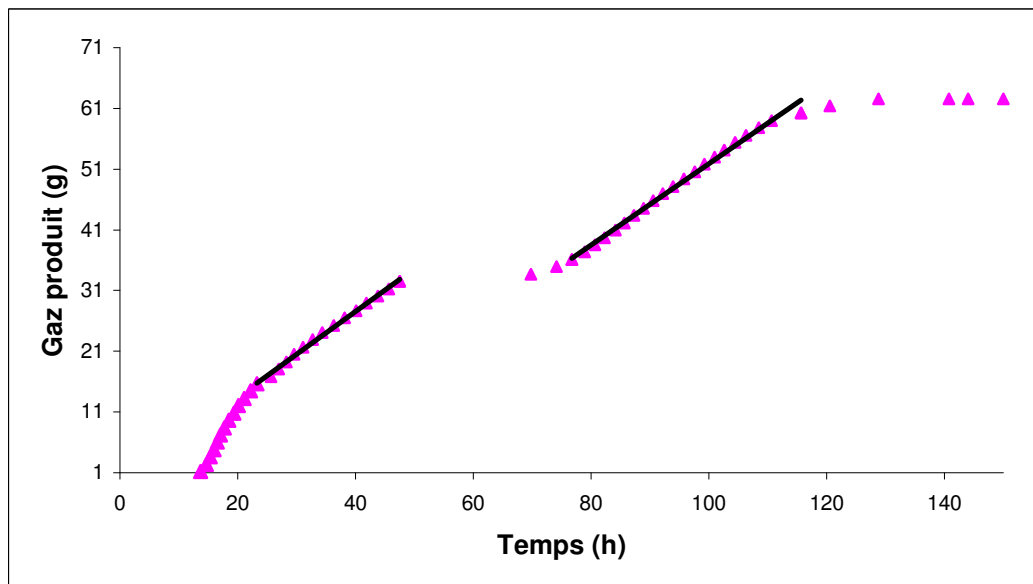


Figure III.15 : Evolution de la masse de CO_2 produit pour le réacteur 1.

Le profil d'évolution du pH et du potentiel redox est fourni sur la figure III.16. Le pH est maintenu à sa valeur de consigne sur toute la durée de la culture. Le potentiel redox est à stabilisé à sa valeur initiale (- 450 mV) jusqu'à 21 h de culture, après quoi il y a un brusque décrochage et la valeur se stabilise vers - 650 mV. Cette variation brutale du potentiel redox doit être comparée à la stabilité observée pour la culture de référence (Figure III.9). il faut aussi signaler que la valeur initiale de potentiel - 450 mV est de 100 mV inférieure à la valeur de la culture de référence (- 350 mV).

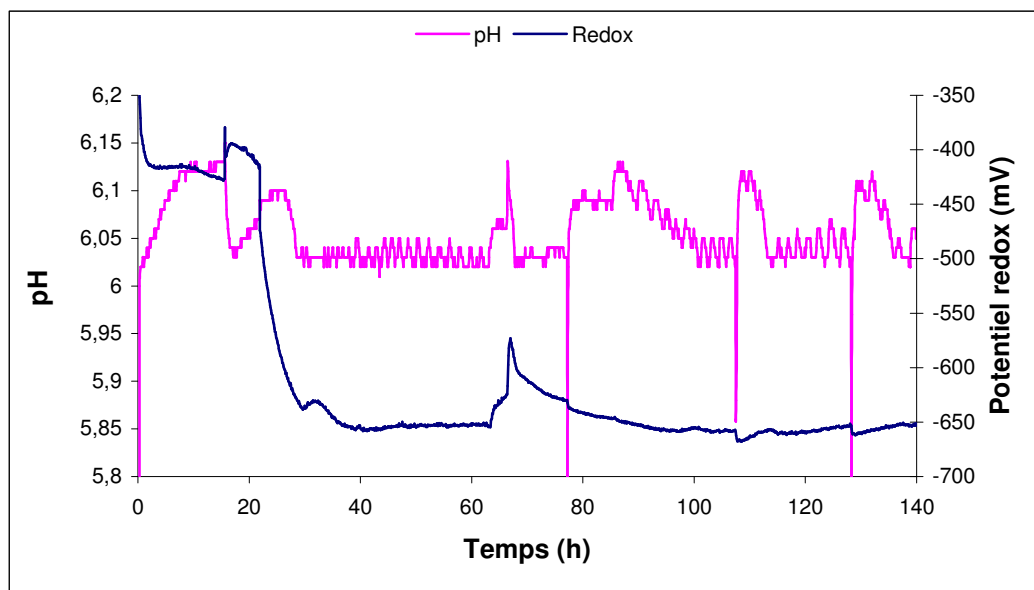


Figure III.16 : Evolution du pH et du potentiel redox en cours de culture en fed-batch (réacteur 1).

Afin de vérifier l'efficacité des contrôles et des régulations utilisés sur le procédé de fermentation, le bouclage des bilans carbone et azote a été vérifié comme précédemment. Les résultats sont regroupés dans les tableaux III.9 et III.10.

	Entrées		Sorties			
Source	Substrat	Carbonate	Résidus	AGV	CO ₂	Biomasse
Total C (g)	32	2,34	2,56	8,06	18,86	3,58
Total C (g)	34,34		33,06			
Bilan %	96%					

Tableau III.9 : Vérification du bilan carbone.

	Entrées		Sorties		
Source	Substrat	N-NH3	Résidus	N-NH3	Biomasse
Total N (g)	0	0,51	0	0,13	0,34
Total N (g)	0,51		0,47		
Bilan %	92%				

Tableau III.10 : Vérification du bilan azote.

Ces bilans montrent que 23,5 % du carbone a été converti en AGV, 54,9 % en CO₂ et 10,4 % en biomasse, de même 66,7 % de l'azote disponible dans le milieu a été utilisé pour constituer la biomasse.

4.1.2 Interprétation et discussion des résultats sur le réacteur 1

Les résultats précédents indiquent que les analyses réalisées sont cohérentes et qu'il y a similitude avec les résultats obtenus pour la culture de référence jusqu'à environ 20 h. Après quoi, des différences importantes existent. Par ailleurs, le renouvellement des sources de carbone et d'azote à 50 h ne permet pas de relancer la croissance de *F.s.*, le métabolisme général observé dans le réacteur étant plutôt du type « maintenance » que croissance.

L'interprétation qui peut en être donnée est que le réacteur a été contaminé par une autre souche ou que le métabolisme énergétique de *F.s.* a été complètement redirigé (ce qui est peu probable). En fait la chute brutale du potentiel redox d'environ 200 mV après 20 h de culture paraît indiquer que le métabolisme de production du succinate est éteint, la chaîne de transport d'électrons de *F.s.* qui conduit à la production de succinate étant nécessairement très perturbée. Par ailleurs, si le bilan de recouvrement du carbone est très satisfaisant (Tableau III-9), il est impossible de construire une équation stœchiométrique qui tienne compte des bilans sur les autres éléments H et O (bilan d'électrons) en utilisant les seuls composés que l'on a retrouvés dans le milieu.

La seule conclusion possible, compte tenu des mesures qui ont été réalisées, est de considérer que la culture a été le siège de la synthèse de méthane, dont la production s'est retrouvée mélangée au CO₂ produit. Comme la mesure du gaz produit est une mesure de volume, le

nombre de moles de gaz produit reste inchangé et comme CO_2 et CH_4 sont deux gaz monocarbonés, ceci ne modifie en rien le bilan carbone. Cette interprétation est confirmée par la chute brutale du potentiel redox qui atteint des valeurs suffisamment négatives pour que les premières étapes de la synthèse de méthane puissent être initiées (Gottschalk, 1986). Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de confirmer cette hypothèse en mesurant la composition du gaz produit sur cette culture.

L'origine de cette production peut être de deux natures : soit une contamination par une bactérie méthanogène, soit, hypothèse beaucoup moins probable, un basculement métabolique de *F.s.*, ce qui n'a jamais été observé et nécessiterait un métabolisme central de production d'énergie complètement différent.

C'est la raison pour laquelle, nous avons recherché la présence d'éventuels contaminants dans le milieu de culture par des techniques de biologie moléculaire. Ces résultats seront présentés dans le dernier chapitre.

4.2 Réacteur 2

4.2.1 Présentation des résultats expérimentaux

Comme dans la culture précédente (réacteur 1), le glucose a été ajouté en fed-batch. Partant d'une concentration initiale de $13,5 \text{ g.L}^{-1}$, une recharge de glucose a été réalisée à 75 h de culture pour repartir de $16,7 \text{ g.L}^{-1}$. Les résultats obtenus sont reportés dans les figures III.17, III.18 et III.19 et dans le tableau III.11.

Par rapport à la culture de référence, on constate que la synthèse de succinate apparaît seulement à partir de 48 h ($2,17 \text{ g.L}^{-1}$) alors que du butyrate est synthétisé dès le début et que cette synthèse perdure durant toute la culture pour atteindre $10,4 \text{ g.L}^{-1}$. De même la synthèse d'acétate apparaît dès le début et la concentration augmente régulièrement tout au long de la culture pour atteindre $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ (Figure III.17 et Tableau III.11).

Temps (h)	CO ₂ (g.L ⁻¹)	Glucose (g.L ⁻¹)	Acétate (g.L ⁻¹)	Succinate (g.L ⁻¹)	Butyrate (g.L ⁻¹)	Formiate (g.L ⁻¹)
0	0	13,49	0	0	0	0
24	0,16	10,78	0,06	0,05	0,76	0,09
47	1,50	3,43	0,77	2,18	0,77	0,01
55	3,27					
65	5,80					
74	6,70	2,19	2,49	1,95	4,83	0,32
74,5	6,70	16,73	2,49	1,95	4,83	0,79
85	9,72					
95	11,95					
105	13,30					
116	14,42	16,44	3,81	1,98	9,38	0,79
140	17,38					
170	19,40					
216	20,23	3,89	3,99	1,57	10,44	0,86

Tableau III.11 : Concentration en substrats et en métabolites obtenus pour le réacteur 2.

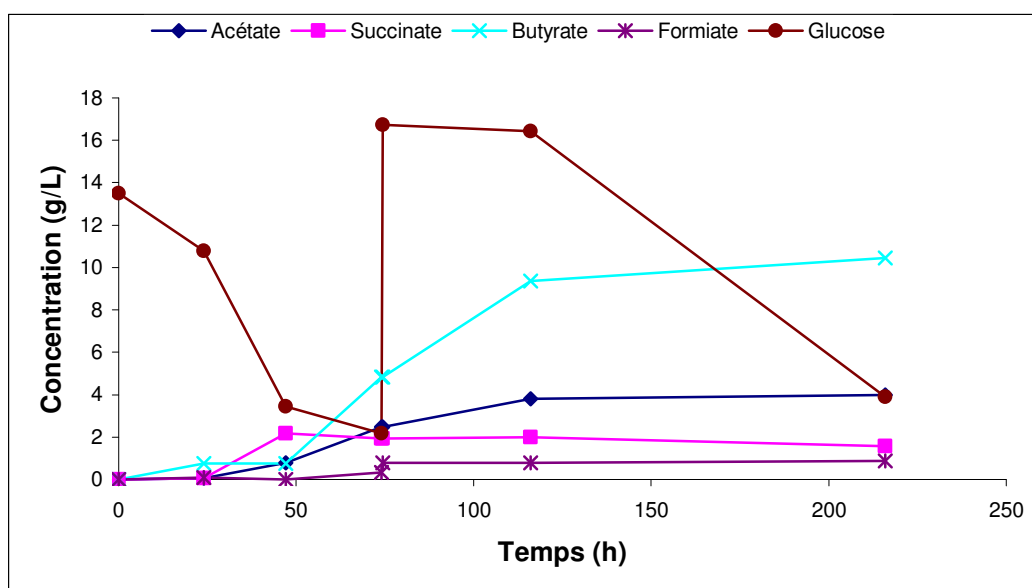


Figure III.17 : Evolution des concentrations en métabolites et en glucose pour le réacteur 2.

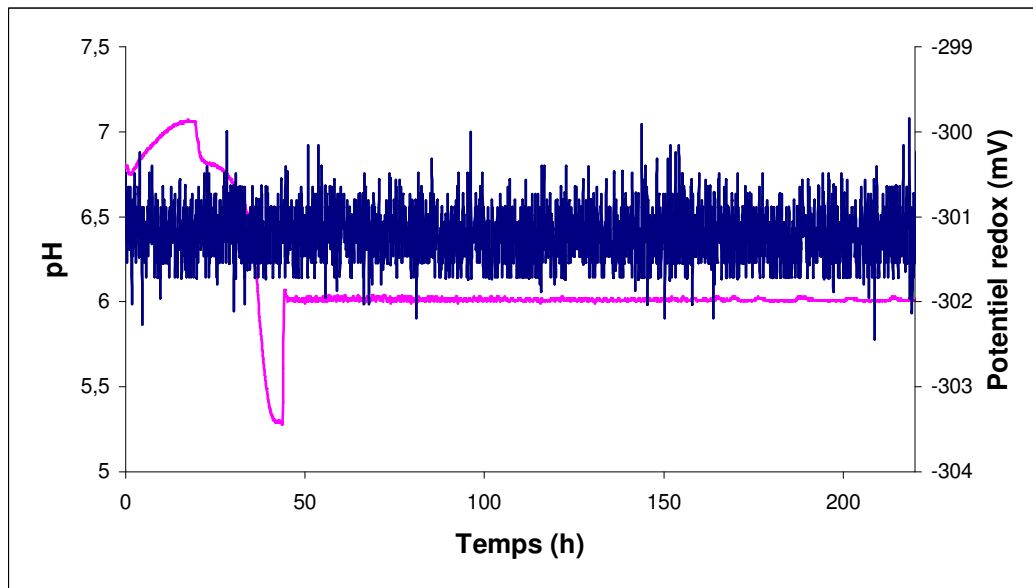


Figure III.18 : Evolution du pH et du potentiel redox pour le réacteur 2.

Le potentiel redox (Figure III.18) reste stable à sa valeur initiale – 300 mV qui est de 50 mV supérieure à la valeur pour une culture de référence.

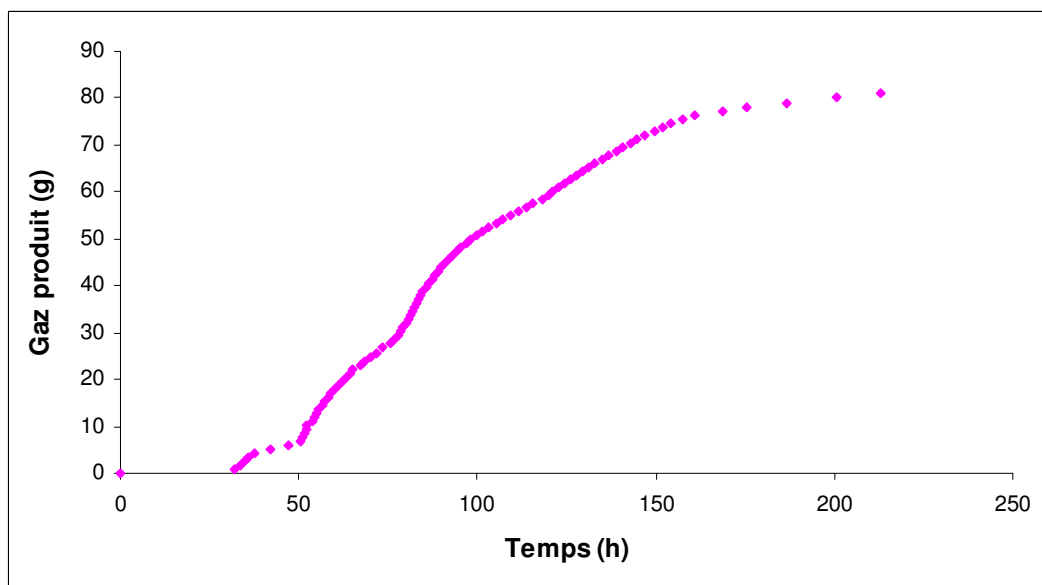


Figure III.19 : Evolution de la production en gaz pour le réacteur 2.

La production de gaz, qui est exprimée en g de CO₂, démarre véritablement après 48 h de culture et s'établit à une vitesse pratiquement constante d'environ 0,3 gCO₂.L⁻¹.h⁻¹ (1,2 g.h⁻¹) avant l'ajout de glucose. Cette vitesse est restaurée après l'ajout de glucose et elle décroît progressivement jusqu'à la fin de l'expérience.

Les taux de recouvrement du carbone et de l'azote sont fournis dans les tableaux III.12 et III.13.

	Entrées		Sorties			
Source	Substrat	Carbonate	VFA	CO2	Biomasse	Résidu
Total C (g)	48,4	8,6	33,0	22,1	1,3	6,2
Total C (g)	57		62,6			
Bilan %	109,8%					

Tableau III.12 : Vérification du bilan carbone pour le réacteur 2.

	Entrées		Sorties		
Source	Substrat	N-NH3	Résidus	N-NH3	Biomasse
Total N (g)	0	0,512	0	0,256	0,2067056
Total N (g)	0,512		0,4627056		
Bilan %	90%				

Tableau III.13 : Vérification du bilan azote pour le réacteur 2.

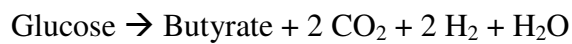
Contrairement aux expériences précédentes, on constate que le taux de recouvrement du carbone est supérieur à 100%.

4.2.2 Interprétation et discussion des résultats sur le réacteur 2

Comme pour le réacteur 1, les résultats paraissent significativement différents de ceux de la culture de référence. Ceci se traduit dès le début de la culture par la synthèse de butyrate. Néanmoins, la synthèse de succinate témoigne de la croissance de *F.s.*.

Deux hypothèses peuvent être avancées : (i) la culture a été contaminée par une bactérie de type *Clostridium* ; (ii) *F.s.* possède dans certaines conditions un métabolisme capable de fermenter le glucose en butyrate.

Quelle que soit la réponse, un métabolisme de ce type implique en anaérobiose la présence d'une ferredoxine qui décarboxyle le pyruvate formant de l'acétyl-CoA. Comme le potentiel de cette ferredoxine est très bas (- 450 mV) les deux atomes d'hydrogène peuvent être transférés à la deshydrogénase ($2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2$) qui a un potentiel du même ordre de grandeur, de telle sorte que, même dans un environnement saturé en H_2 , le dihydrogène peut être produit. De façon globale, ce mécanisme conduit à l'équation stoechiométrique suivante :



L'étude détaillée de cette voie (Gottschalk, 1986) montre que 3 ATP peuvent être régénérés par phosphorylation liée au substrat.

En réalisant un bilan des phénomènes observés après addition de glucose entre 75 h et 115 h, on constate d'ailleurs que le nombre de moles de biogaz produit est d'ailleurs 4 fois supérieur au nombre de moles de glucose consommé qui est aussi du même ordre que le nombre de moles de butyrate produits. Les résultats sont reportés dans le tableau III.14.

Δ glucose	Δ acétate	Δ butyrate	Δ « biogaz »
7,13	2,5	6,37	30,7

Tableau III.14 : Variation des nombres de moles x 100 pour les substrats et produits de la culture du réacteur 2 entre 75 h et 115 h.

Par ailleurs, ces résultats expliquent que le taux de recouvrement du carbone calculé en considérant que le biogaz est formé uniquement de CO_2 , est supérieur à 100% (Tableau III.12). Si l'on considère que le biogaz contient 40% de H_2 , le taux de recouvrement du carbone est ramené à la valeur de 94,6%, ce qui est un chiffre parfaitement classique.

Ces résultats confirment donc l'hypothèse qui a été faite, bien que l'interprétation métabolique précédente doive être affinée pour tenir compte de la production d'acétate.

Il ne nous est pas possible de trancher entre l'hypothèse d'une contamination par une Clostridie ou un basculement métabolique de *F.s.*. La recherche de contaminants par des techniques de biologie moléculaire (Chapitre VI) tentera d'éclaircir ce point.

Enfin comme pour le réacteur 1, le potentiel redox paraît être une variable clé pour le contrôle métabolique du (ou des) micro-organismes présents dans le bioréacteur.

5 DISCUSSION

Les cultures effectuées sur glucose révèlent la complexité de la mise en œuvre d'une culture pure de *Fibrobacter succinogenes*. Le suivi et la régulation du pH ainsi que le suivi du potentiel d'oxydoréduction montrent qu'il est possible de respecter les conditions optimales à la croissance de *F.s.* Dans ces conditions, le glucose est fermenté pour produire du succinate, de l'acétate, du formiate et du CO₂ (Bryant et Burkey, 1953 ; Scheifinger et Wolin, 1973 ; Steward et Flint, 1989 ; Weimer, 1993) conformément à des rapports qui paraissent être caractéristiques du fonctionnement métabolique de la bactérie.

Les analyses stoechiométrique et cinétique qui ont été réalisées montrent que la croissance et la maintenance de *F.s.* peuvent être caractérisées. Le trait principal du métabolisme de *F.s.* est la production de succinate qui est très probablement associée au métabolisme énergétique. Cette production est corrélative à la production d'acétate (environ en quantité molaire 3 fois moindre) et à la production de formiate.

Il est apparu d'autre part difficile de maintenir une culture pure (ou un métabolisme constant) sur une longue période, la culture pouvant être le siège du développement d'autres micro-organismes capables de synthétiser du butyrate ou du méthane. Généralement ceci se traduit, en culture liquide agitée (composition liquide à priori homogène), par une modification du potentiel redox qui traduit un mode différent de synthèse de l'ATP de celui de *F.s.* La production de succinate, qui a été systématiquement observée dans les premières heures de culture, est alors stoppée et le succinate n'est généralement pas reconsommé et reste à la valeur maximale obtenue.

Néanmoins, le potentiel redox reste une variable difficile à mesurer, l'étalonnage de la sonde étant modifié d'une culture à l'autre. Sachant aussi que le « calage » est réalisé pour les potentiels positifs, les mesures de potentiel présentées résultent d'extrapolations qui peuvent être discutables.

La technique de contrôle du recouvrement du carbone et de l'azote montre l'efficacité du contrôle du procédé et confirme la validité des méthodes et des techniques utilisées pour déterminer les quantités de substrats consommés et de produits formés. En effet, les taux de recouvrement du carbone et de l'azote sont supérieurs à 90 %.

L'ensemble de ces techniques de culture et d'analyse des résultats est donc valide et permet d'aborder les expériences sur la dégradation de substrats complexes comme les végétaux. L'analyse stoechiométrique des résultats et la vérification des bilans matière seront bien entendu conservées.

6 CONCLUSION ET RECAPITULATION

Les principaux résultats obtenus dans ce chapitre peuvent être récapitulés comme suit :

- Les techniques d'analyse des cultures de *F.s.* permettent de suivre convenablement les éléments C et N ; les techniques sont donc validées pour les études de dégradation des substrats végétaux complexes.
- La culture pure de *F.s.* en milieu liquide est difficile à stabiliser dans un état où seule la synthèse de succinate, d'acétate et de formiate est observée ; ce sont néanmoins les produits les plus caractéristiques du métabolisme de *F.s.* pour lesquels les analyses stoechiométriques et cinétiques ont été réalisées.
- Le potentiel redox est certainement une variable caractéristique du métabolisme dominant mais il est pour l'instant difficile de le contrôler.

CHAPITRE IV

DEGRADATION DES VEGETAUX

1 INTRODUCTION

Les méthodes de culture et d'investigation ont été validées pour des cultures sur glucose en cuve agitée homogène. Ces méthodes sont appliquées pour des cultures plus complexes que sont les végétaux.

Le choix des végétaux a été basé sur les végétaux utilisés dans le projet MELiSSA et particulièrement dans le projet MAP. Ce choix s'est porté sur les plantes suivantes : chou, paille de blé et tourteau de soja. En effet, la ration alimentaire des cosmonautes sera composée d'un consortium de plantes supérieures (blé, choux, tomate, soja...etc.) et d'un organisme photosynthétique qui pourra servir de source de protéines (compartiment IVa). Dans le projet MAP qui est l'objectif de ce travail, il a été décidé d'étudier la dégradation des déchets à partir d'un substrat « modèle » composé de trois déchets végétaux : paille de blé, tourteau de soja et chou. On a ajouté à ces trois végétaux un extrait de spirulines et de matières fécales, l'ensemble constituant le substrat modèle du projet MAP.

Pour apprécier la différence entre les trois substrats végétaux nous avons décidé de dégrader ces trois végétaux dans un premier temps séparément puis en mélange (1/3 de chaque).

Ce chapitre présente les résultats obtenus sur ces substrats.

2 RESULTATS EXPERIMENTAUX

2.1 Détermination des temps de séjour nécessaires à la dégradation des particules solides

De façon intuitive, on conçoit que le temps de séjour d'une particule solide de substrat influe sur sa dégradation : un temps de séjour trop court ne permet pas une digestion totale des substrats accessibles ; un temps de séjour inutilement long ne conduit pas à une augmentation du rendement de dégradation.

L'étude de l'influence du temps de séjour du solide dans le réacteur a été réalisée avec le RUSITEC (chapitre II.3.3). Ce dispositif permet de travailler avec plusieurs réacteurs en parallèle de façon miniaturisée et permet de déterminer le rendement de dégradation plus facilement par récupération du sac en nylon en fin de culture. Les temps de séjour ont été déterminés pour les végétaux séparément : paille, soja et chou et pour le mélange de végétaux (1/3 de chaque).

Le temps de séjour qualifié d'optimal correspond à une dégradation maximale dans un minimum de temps. Au delà de ce temps, le bénéfice de la dégradation est faible comparé au temps additionnel.

Après une stérilisation de type acide / base du réacteur, 600 mL de milieu synthétique sont préparés dans un Erlenmeyer contenant le substrat enfermé dans le sac de nylon. Le milieu est ensuite autoclavé et réduit puis transféré dans le réacteur (stérilisé) sous la hotte à flux laminaire. Parallèlement une préculture de 100 mL est préparée dans un Erlenmeyer à double piquage. Le réacteur est inoculé avec la préculture de 12 h sous flux de CO₂. En fin de culture le sac de nylon est récupéré, séché et pesé afin de déterminer la quantité de substrat résiduel.

Les résultats obtenus sont réportés sur la figure IV.1. Nous avons reporté les taux de dégradation à 24, 48, 72, 96, 110 h. On constate qu'après 24 h le chou a pratiquement atteint le taux de dégradation maximal alors qu'il faut 72 h pour que la paille soit significativement dégradée. Le temps de séjour maximal obtenu avec le RUSITEC pour la dégradation de la paille par *Fibrobacter succinogenes* est de 110 h (4,6 jours) avec 27,8% de dégradation ; pour la dégradation du soja le temps de séjour maximal est de 72 h avec 41,2% de dégradation et pour la dégradation du chou il est de 48 h avec 73,4% de dégradation.

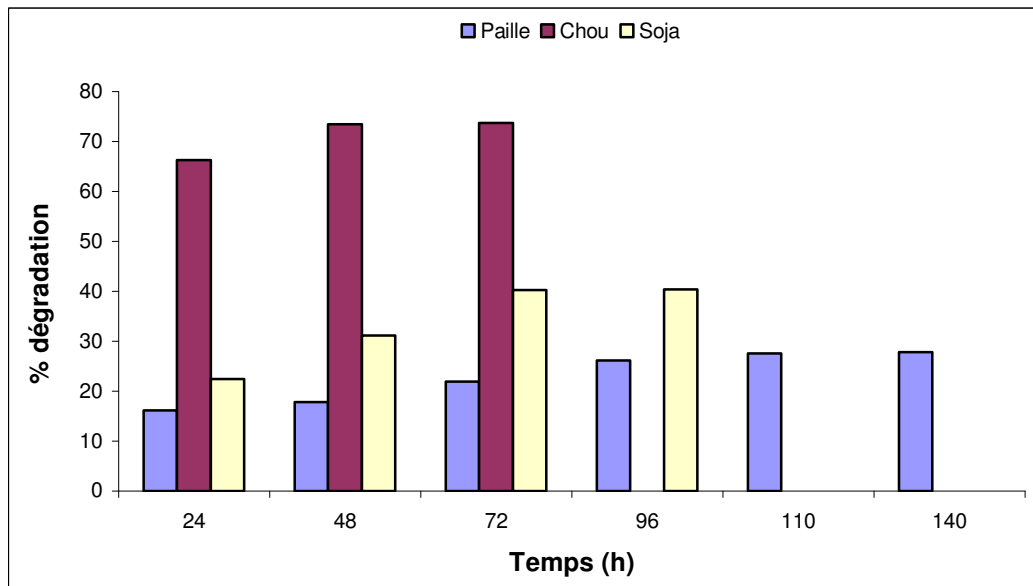


Figure IV.1 : Temps de séjours optimal pour les végétaux séparément

Le temps de séjour optimal obtenu avec le RUSITEC pour la dégradation du mélange de végétaux par *Fibrobacter succinogenes* est de 300 h (12 jours) avec 64% de dégradation (Figure IV.2). La dégradation entre 240 h et 300 h est 0,08%/h tandis que le bénéfice de dégradation entre 300 h et 350 h est 0,02%.h⁻¹. On constate que le temps de séjour optimal n'est pas égal au plus long des trois temps de séjour maximaux sur les trois végétaux mais en est la résultante. Il est probable que *F.s.* dégrade le mélange de façon séquentielle, c'est-à-dire les végétaux les uns après les autres et non en même temps. Cependant le passage d'un type de particule à l'autre ne doit pas être immédiat puisque la somme des trois temps de séjour optimaux donne 230 h et non pas 300 h. Par contre la dégradation obtenue (64%) est supérieure à celle que l'on pouvait attendre puisque la moyenne des trois taux de dégradation précédents donne seulement 47%.

Donc le fait d'utiliser un mélange de végétaux semble ralentir la dégradation qui se poursuit malgré tout plus loin que pour les végétaux pris indépendamment.

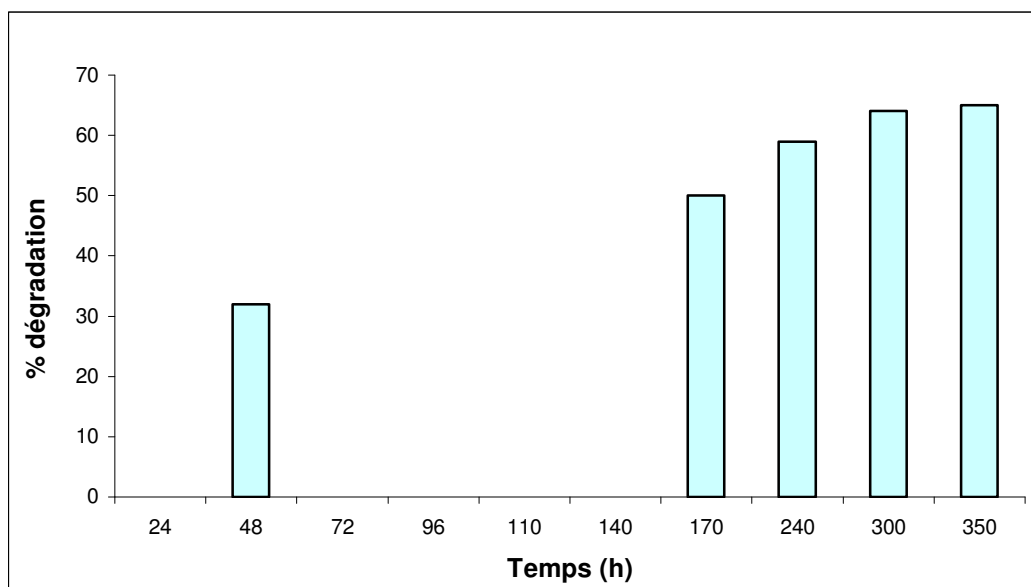


Figure IV.2 : Temps de séjours optimal pour les végétaux en mélange.

2.2 Dégradation des végétaux séparément en bioréacteur

2.2.1 Dégradation de la paille

La source de carbone et d'énergie est constituée de paille finement broyée. 40 g de paille autoclavée (121°C, 20 min) ont été introduits dans le milieu de culture au temps 0 puis trois ajouts de 40 g ont été effectués à 120, 220 et 330 h de culture en suivant les résultats obtenus concernant le temps de séjour optimal (110 h environ) (§ 2.1). Très peu de CO₂ a été produit au cours de cette culture. Par conséquent il ne peut être ici un indicateur d'ajout de substrat. Le procédé a été maintenu durant 470 h incluant 3 additions de paille.

Des productions (Figure IV.3) lentes en succinate, en acétate, en formiate et en butyrate sont observées jusqu'à 220 h de culture avec des productions respectivement de 1,39 g.L⁻¹ (0,025 g.h⁻¹), 0,823 g.L⁻¹ (0,014 g.h⁻¹), 0,411 g.L⁻¹ (0,007 g.h⁻¹) et 1,56 g.L⁻¹ (0,028 g.h⁻¹). La concentration en formiate reste stable après le premier ajout jusqu'à la fin de la culture. Entre le deuxième (220 h) et le troisième (330 h) ajout de paille les productions en succinate, acétate et butyrate augmentent fortement. En effet, des productions moyennes de 0,051 g.h⁻¹ pour le succinate, 0,034 g.h⁻¹ pour l'acétate et 0,037 g.h⁻¹ pour le butyrate sont observées. Ces

productions ensuite se stabilisent jusqu'à la fin de la culture. L'évolution de la concentration en azote est la même que celle des métabolites principaux c'est-à-dire une phase de consommation lente entre 0 h et 220 h ($0,93 \text{ mg.h}^{-1}$), une phase de consommation plus rapide entre 220 h et 330 h ($1,62 \text{ mg.h}^{-1}$) et une stabilisation en fin de culture ($0,13 \text{ mg.h}^{-1}$).

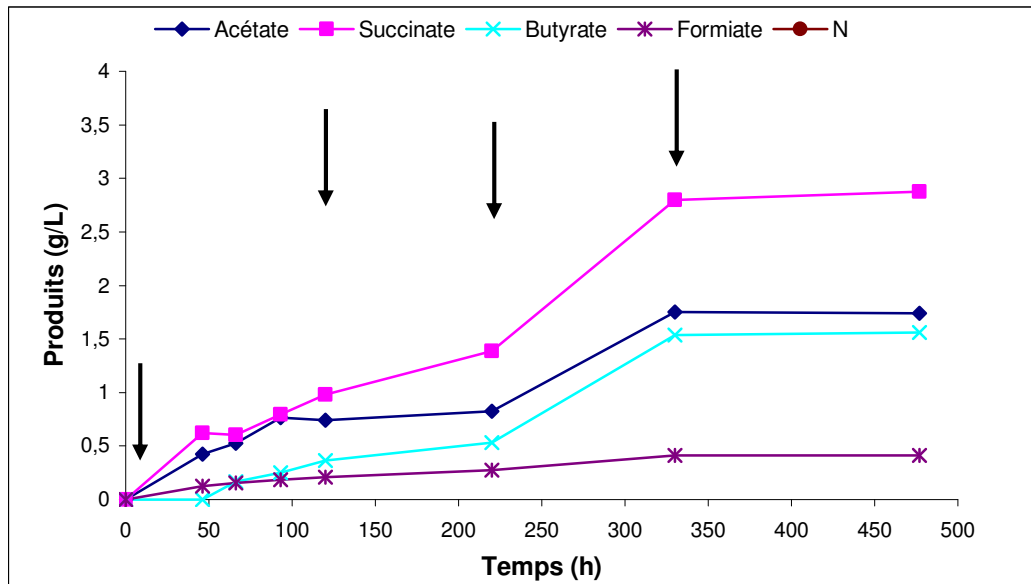


Figure IV.3 : Evolution des métabolites et de l'azote au cours de la fermentation de la paille, ➔ : Ajout de paille.

La production de CO_2 (non montrée) est très faible au cours de cette culture et la pression a augmenté de 0,15 bars en 470 h. Le rendement de dégradation est faible soit 23,8%. De même l'analyse de la composition (Tableau IV.1) en fibre révèle des rendements de dégradation des fibres totales, de l'hémicellulose, de la cellulose et de la lignine faibles (30,5%, 48,4%, 26,9% et 0%) et ceci malgré des taux de recouvrement carbone et azote corrects respectivement 96% et 91%. 16,4% du carbone a été converti en AGV, 5,4% en biomasse et seulement 0,07% en CO_2 . Ceci montre que *Fibrobacter succinogenes* est peu efficace pour la dégradation de la paille.

	Fibres totales		Hémicellulose		Cellulose		Lignine	
	% MS	g	% MS	g	% MS	g	% MS	g
Substrat (160 g)	72	115,2	26	41,6	39	62,4	7	11,2
Résidu (122 g)	65,65	80,1	17,6	21,5	37,4	45,6	10,69	13
Dégradation (%)	30,5		48,4		26,9		0	

Tableau IV.1 : Analyse de la composition en fibres par la méthode de Van Soest

2.2.2 Dégradation de tourteau de soja en bioréacteur

La source de carbone et d'énergie est constituée de tourteau de soja finement broyé. 32 g de soja autoclavés (121°C, 20 min) ont été introduits dans le milieu de culture puis à 72, 147, 219, 291 et 363 h de culture en utilisant les résultats obtenus sur le RUSITEC dans le paragraphe 2.1. Le CO₂ ne peut pas être ici un indicateur d'ajout de substrat car la production en CO₂ durant cette culture est très faible. Le procédé a été maintenu durant 480 h avec 5 additions de tourteau de soja.

Des productions (Figure IV.4) en succinate et en acétate sont observées entre 0 et 72 h avec des productions respectivement de 0,89 g.L⁻¹ (0,049 g.h⁻¹) et 0,66 g.L⁻¹ (0,037 g.h⁻¹) à 72 h. Une consommation en succinate est observée jusqu'à 219 h. Les productions en propionate et en formiate commencent après 72 h. A 220 h les productions en succinate, acétate, formiate et propionate augmentent puis se stabilisent à 291 h jusqu'à la fin de la culture. Aucune production de butyrate n'est observée lors de la culture sur soja.

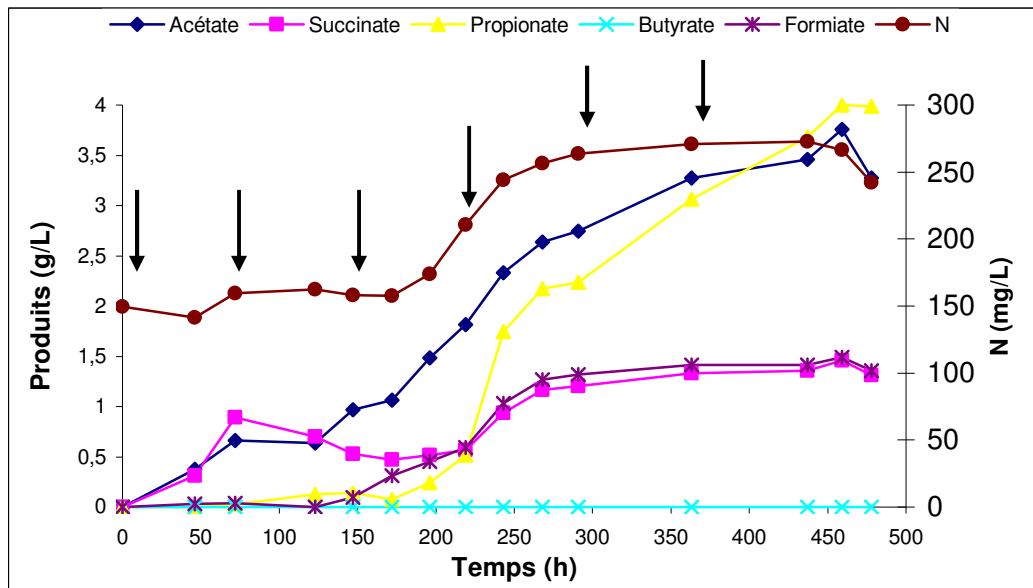


Figure IV.4 : Evolution des métabolites et de l'azote pendant la fermentation du soja,
➔ : Ajout de soja.

La concentration en azote reste stable durant les 170 premières heures puis augmente jusqu'à la fin de la culture. Cette production d'azote est certainement due à la libération d'azote du soja (riche en protéines) pendant sa dégradation.

Très peu de CO_2 a été produit pendant cette dégradation en effet l'électrovanne s'est ouverte 2 fois libérant 1,4 L de CO_2 et produisant 2,4 g de CO_2 .

Le rendement de dégradation mesuré en fin de culture est de 43,3% avec 51,9% de dégradation des fibres totales, 57,3% de l'hémicellulose, 56,5% de la cellulose et 1,05% de la lignine (Tableau IV.2). Ces taux de dégradation sont plus élevés que ceux obtenus pour une culture sur paille.

	Fibres totales		Hémicellulose		Cellulose		Lignine	
	% MS	g	% MS	g	% MS	g	% MS	g
Substrat (191,2 g)	12	22,9	5	9,6	6	11,5	1	1,91
Résidu (110,6 g)	9,96	11,02	3,7	4,1	4,5	5	1,71	1,89
Dégradation (%)	51,9		57,3		56,5		1,05	

Tableau IV.2 : Analyse de la composition en fibres par la méthode de Van Soest

Les taux de recouvrement carbone et azote obtenus sur cette culture sont supérieurs à 90% (respectivement 90% et 92%). Le bilan carbone montre que 23,8% du carbone a été converti en AGV, 0,9% en CO₂ et 1,1% en biomasse.

2.2.3 Dégradation de chou en bioréacteur

La source de carbone et d'énergie est constituée de chou vert haché au robot manager. 20 g (matière sèche) de chou autoclavé (121°C, 20 min) ont été introduits dans le milieu de culture au temps initial puis à 66, 120 et 165 h de culture. Le procédé a été maintenu durant 270 h avec 3 additions de chou.

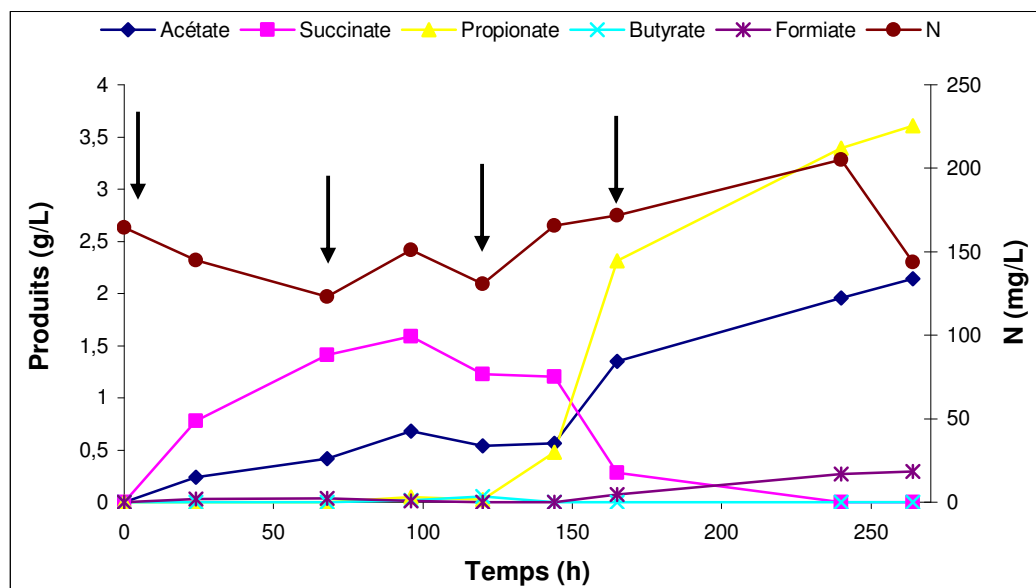


Figure IV.5 : Evolution des concentrations en métabolites et en azote pendant la dégradation du chou, ➔ : Ajout de chou.

La figure IV.5 représente l'évolution des concentrations en métabolites et en azote. Des productions en succinate et en acétate sont observées durant les 100 premières heures de culture respectivement 1,59 g.L⁻¹ (0,066 g.h⁻¹) et 0,63 g.L⁻¹ (0,026 g.h⁻¹). La concentration en succinate diminue ensuite jusqu'à une consommation complète du succinate. Dans le même

temps (140 h), une production de propionate est observée jusqu'à la fin de la culture pour atteindre une concentration de $3,61 \text{ g.L}^{-1}$ ($0,05 \text{ g.h}^{-1}$), ainsi qu'une augmentation de la concentration en acétate jusque $2,14 \text{ g.L}^{-1}$ ($0,032 \text{ g.h}^{-1}$). La concentration en azote reste stable jusqu'à 140 h de culture puis augmente faiblement pour diminuer en fin de culture.

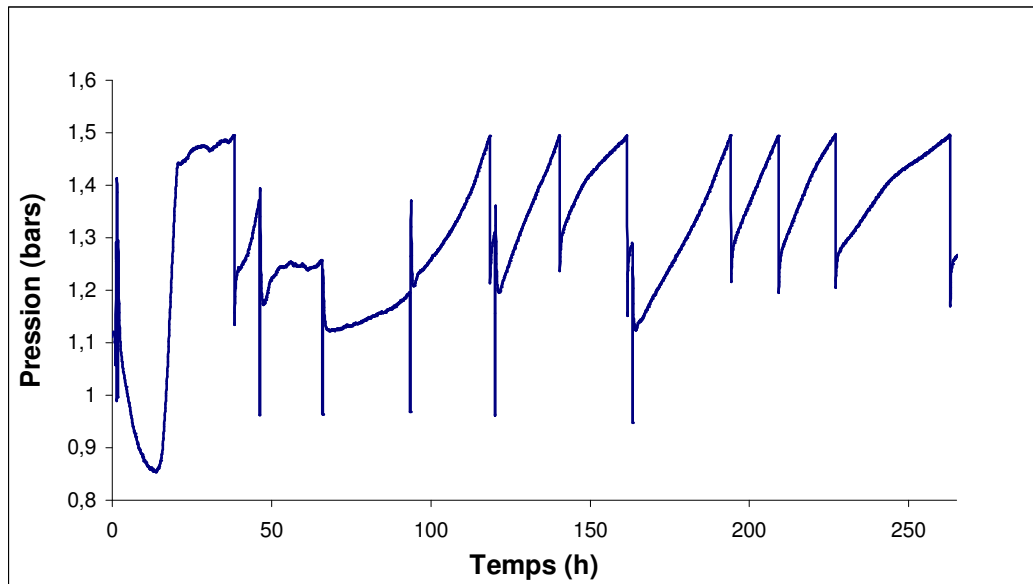


Figure IV.6 : Evolution de la pression pendant la dégradation du chou.

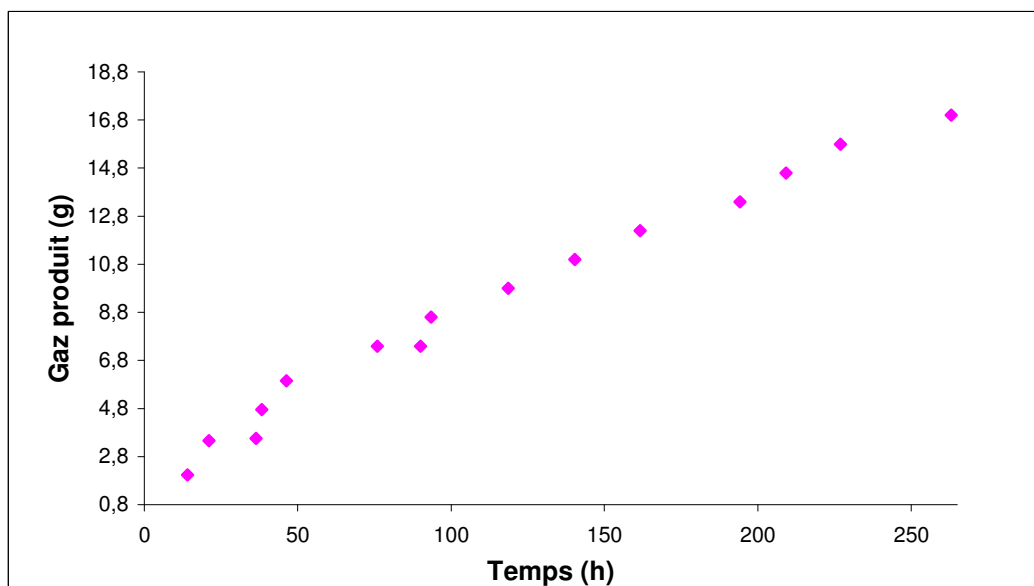


Figure IV.7 : Evolution de production en gaz pendant la dégradation du chou.

La production de CO₂ (Figures IV.6 et IV.7) est faible pendant cette dégradation. En effet l'électrovanne s'est ouverte 14 fois libérant 9,8 L de CO₂ ; en quantité cumulée la masse de CO₂ libérée est de 16,8 g. Cette production s'effectue de façon continue et il n'apparaît pas de palier de production.

Le rendement de dégradation mesuré en fin de culture est de 80,7% avec 63,4% de dégradation des fibres totales, 77,9% de l'hémicellulose, 65,7% de la cellulose et 5,3% de la lignine (Tableau IV.3). Ces rendements de dégradation sont plus élevés que ceux obtenus pour les cultures sur paille et sur soja.

	Fibres totales		Hémicellulose		Cellulose		Lignine	
	% MS	g	% MS	g	% MS	g	% MS	g
Substrat (75,2 g)	16	12,03	2	1,5	13	9,8	1	0,75
Résidu (14,5 g)	30,5	4,4	2,3	0,3	23,2	3,4	4,9	0,71
Dégradation (%)	63,4		77,9		65,7		5,3	

Tableau IV.3 : Analyse de la composition en fibres par la méthode de Van Soest

Les bilan carbone et azote indiquent également que 36,1% du carbone a été converti en AGV, 12,7% en CO₂ et 17,7% en biomasse.

2.3 Dégradation du mélange de végétaux en bioréacteur

La source de carbone et d'énergie est constituée du mélange des trois végétaux précédents. Un mélange stérile (121°C, 20 min) de la paille de blé, du tourteau de soja et du chou (1/3 de chaque) a été introduit dans le milieu de culture initial puis toutes les 150 heures. Le temps de séjour maximal déterminé avec le RUSITEC est de 300 h mais l'arrêt de la production en CO₂ a lieu ici plus tôt. Nous avons donc décidé d'ajouter le mélange toutes les 150 heures. Le procédé a été maintenu durant 1026 h incluant 5 additions de végétaux.

La figure IV.8 représente l'évolution des concentrations en AGV au cours de la dégradation.

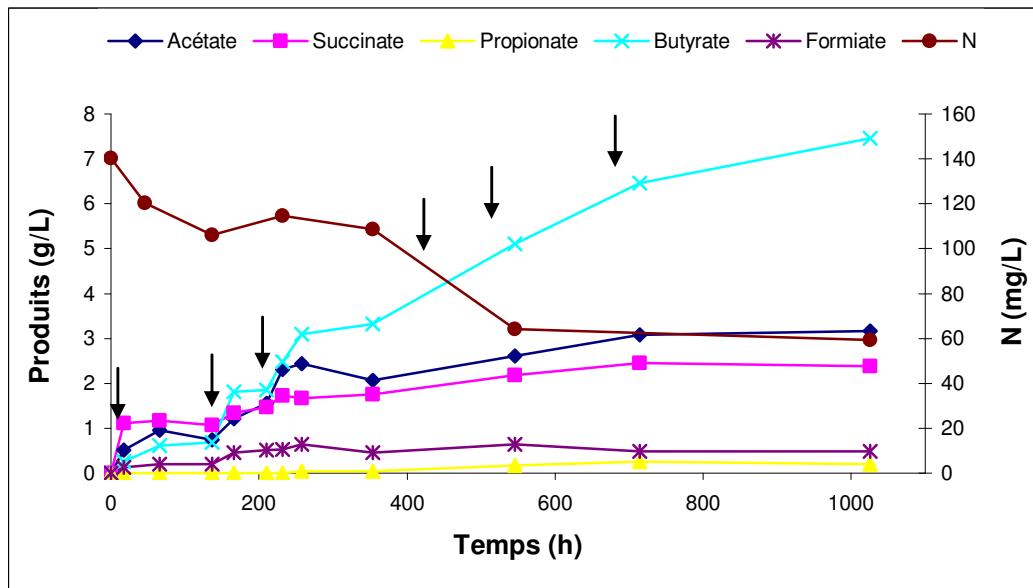


Figure IV.8 : Evolution des métabolites et de l'azote pendant la dégradation des végétaux en mélange, ➔ : Ajout de substrat.

Une production importante de succinate ($1,11 \text{ g.L}^{-1}$ à 17 h de culture ou $0,26 \text{ g.h}^{-1}$) est observée dans les premières heures de culture. Cette vitesse de production a tendance à ralentir dans les heures suivantes ($0,01 \text{ g.h}^{-1}$ entre 17 h et 258 h de culture) puis se stabilise à $2,30 \text{ g.L}^{-1}$. Cette production de succinate représente 17,4% de la quantité totale d'AGV en fin de culture. Les productions d'acétate et de butyrate sont régulières jusque 258 h respectivement $2,44 \text{ g.L}^{-1}$ ($0,04 \text{ g.h}^{-1}$) et $3,096 \text{ g.L}^{-1}$ ($0,048 \text{ g.h}^{-1}$), à 258 h de culture la production d'acétate se stabilise pour atteindre $3,17 \text{ g.L}^{-1}$ ($0,012 \text{ g.h}^{-1}$). La production de butyrate continue d'augmenter de façon plus lente entre 258 h et 1026 h de culture à une vitesse de $0,023 \text{ g.h}^{-1}$ pour atteindre $7,455 \text{ g.L}^{-1}$ en fin de culture. Les productions d'acétate et de butyrate représentent respectivement 23,15% et 54,44% de la production totale en AGV. Les productions de propionate et de formiate restent faibles tout au long de la culture : $0,193 \text{ g.L}^{-1}$ et $0,490 \text{ g.L}^{-1}$. L'azote présent dans le milieu sous forme d'ions ammonium est consommé (de 140 mg.L^{-1} à 60 mg.L^{-1}) au cours de la fermentation.

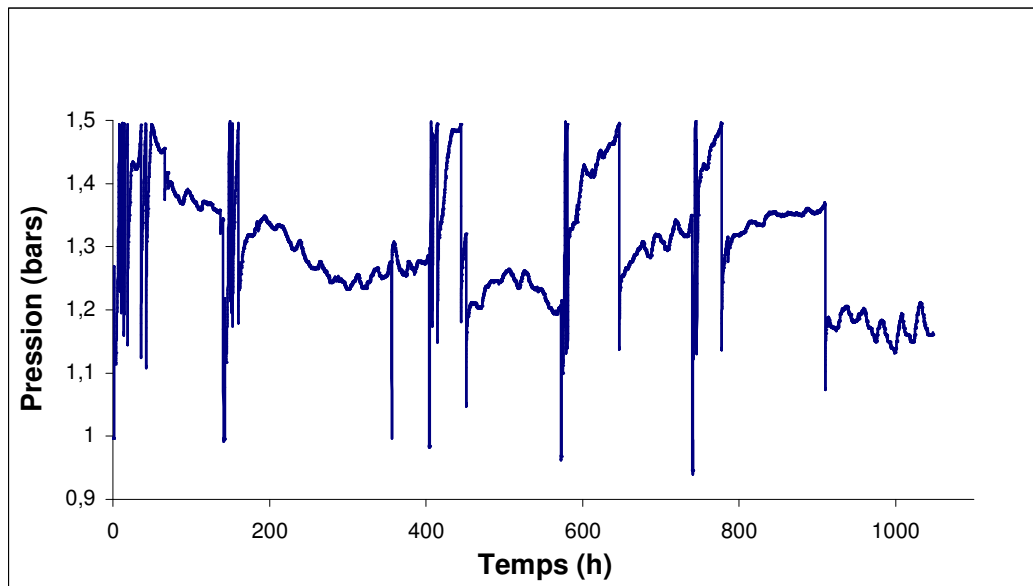


Figure IV.9 : Evolution de la pression pendant la dégradation des végétaux en mélange.

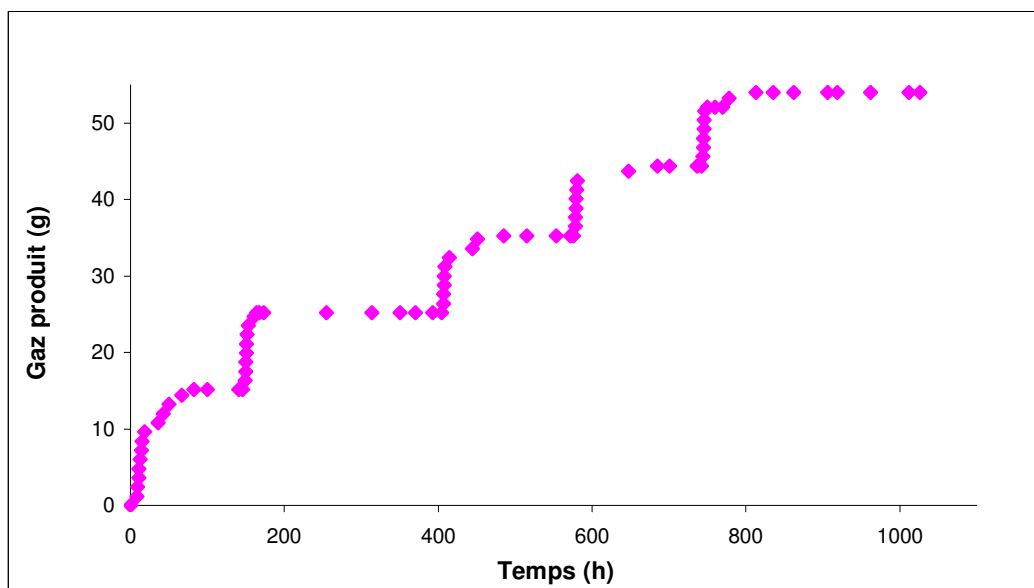


Figure IV.10 : Evolution de la pression pendant la dégradation des végétaux en mélange.

L'évolution de la pression dans le réacteur pendant le processus de dégradation ainsi que la quantité de CO_2 produite sont représentées sur les figures IV.9 et IV.10. Sur la durée de la fermentation (1026 h), l'électrovanne s'est ouverte 45 fois donc 31,5 L de CO_2 ont été

produits, en masse 54 g de CO_2 ont été produits. Cette production augmente après chaque ajout de substrat mais a tendance à diminuer avec le temps. En effet, après inoculation, une quantité de 13,2 g de CO_2 est produite et au deuxième 9,6 g, puis elle diminue jusqu'à 1,2 g après le dernier ajout.

De plus, comme le montre la quantité de CO_2 produite, cette augmentation se fait en palier ce qui confirme que le CO_2 n'est pas produit en continu mais brutalement pendant les quelques heures qui suivent l'addition des substrats.

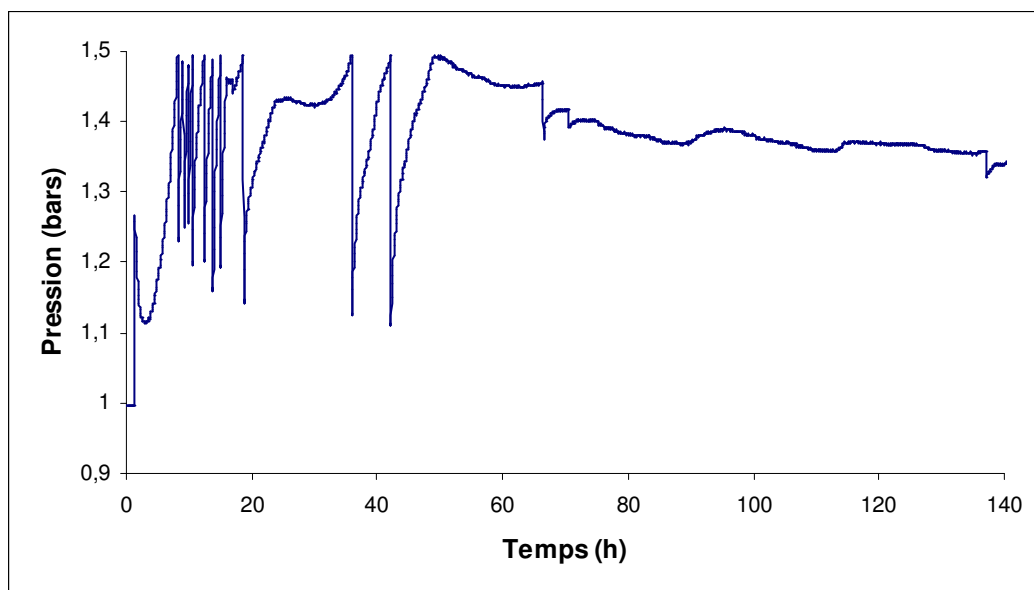


Figure IV.11 : Evolution de la pression pendant le premier batch de la dégradation des végétaux en mélange.

La figure IV.11 décrit l'évolution de la pression en gaz après la première addition de substrat. Il semble que l'addition de substrat entraîne une augmentation importante de la production en CO_2 pendant les 20 premières heures ce qui correspond dans la même période à la diminution de pH (non montré). Après cette première phase, la production continue mais apparaît clairement plus faible jusqu'à la prochaine addition de substrat. Ce phénomène suggère que la dégradation a lieu en deux étapes : une phase rapide de production et une phase plus lente.

Ces deux étapes peuvent être expliquées par la dégradation de deux types de substrats : pendant la première, les substrats facilement dégradables comme des sucres simples libérés

pendant l'autoclave des végétaux ou la cellulose avec un accès plus simple, sont dégradés. Ceci permet une cinétique de dégradation plus importante et donc un métabolisme plus important de *F.s.* ; ensuite la dégradation des fibres de cellulose et hémicellulose, qui sont fortement réticulées avec la lignine, a lieu. La cinétique de dégradation de ces substrats est clairement plus lente ce qui résulte en une décélération du métabolisme de *F.s.*.

Un rendement de dégradation de 70,2% est obtenu. En effet 135,9 g de matière sèche ont été consommés sur les 193,7 g introduit au cours de la fermentation. Ce résultat montre la grande efficacité de *Fibrobacter succinogenes* pour la dégradation de ces végétaux.

La composition en fibres a été déterminée par la méthode de Van Soest (1967). Le tableau IV.4 montre les résultats obtenus sur les substrats et les résidus ainsi que le taux de dégradation de chacun des éléments.

	Fibres totales		Hémicellulose		Cellulose		Lignine	
	% MS	g	% MS	g	% MS	g	% MS	g
Substrat (193,7 g)	35,05	67,9	12	23,2	20,03	38,8	3,07	5,9
Résidu (57,9 g)	49,4	28,6	10,2	5,9	30,9	17,9	8,3	4,8
Dégradation (%)	57,9		74,6		53,83		1,9	

Tableau IV.4 : Analyse de la composition en fibres par la méthode de Van Soest

Les proportions en fibres sont différentes avant et après la fermentation. Ceci confirme l'efficacité de *Fibrobacter succinogenes* sur les fibres en effet 57,9% des fibres totales ont été dégradées avec une dégradation plus importante pour la partie hémicellulosique (74,6%).

Pour valider le procédé, les bilans carbone et azote ont été effectués. Un échantillon de chacun des substrats introduits et un échantillon de la partie non dégradée en fin de fermentation ont été envoyés au CNRS (Centre National de Recherche scientifique) afin d'effectuer des analyses élémentaires (C, H, N, O, S, P). A part le carbone introduit sous forme de déchets végétaux, la seule autre source de carbone introduite dans le milieu de culture est le carbonate utilisé pour la réduction du milieu et pour la régulation du pH au cours de la culture.

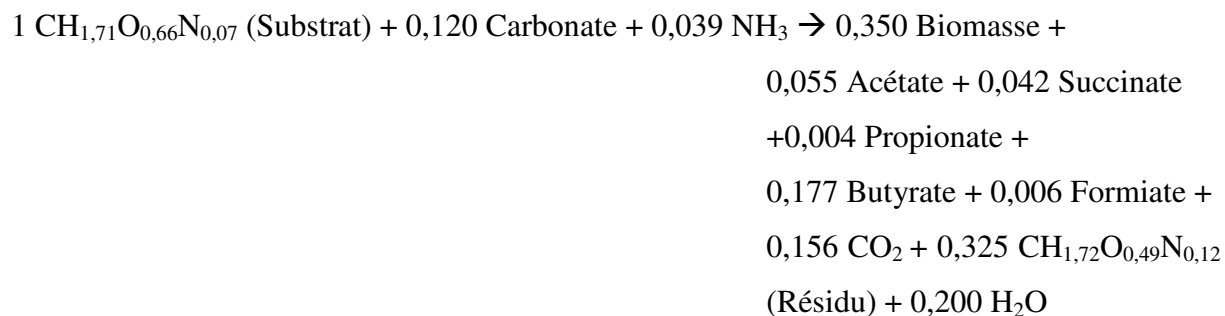
Les taux de recouvrement carbone et azote (respectivement de 94% et de 90%), montrent que 33,3% du carbone a été converti en AGV, 18,2% en CO₂ et 9% en biomasse.

3 MODELISATION DE LA DEGRADATION DES VEGETAUX

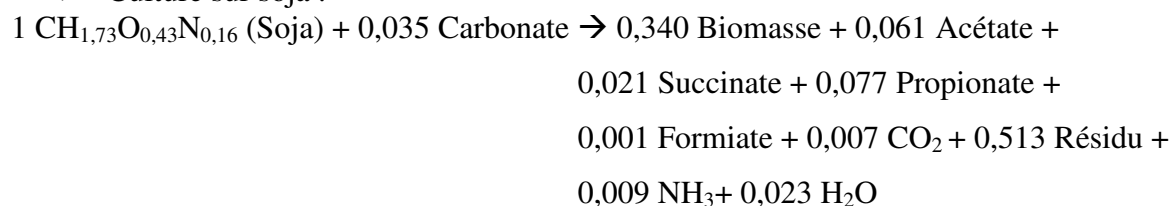
3.1 Analyse stoechiométrique

De la même manière que précédemment au chapitre III, nous avons défini les corps présents, leurs formules C-molaires ainsi que les rendements molaires des réactions nécessaires à l'obtention des équations stoechiométriques. Les équations obtenues sont les suivantes :

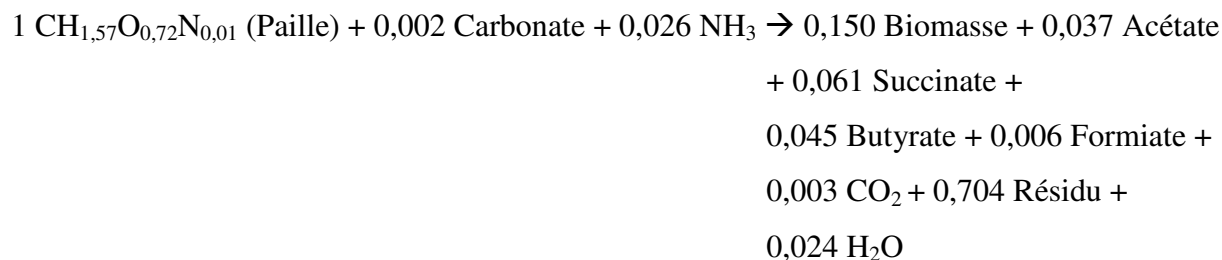
➤ Culture sur le mélange



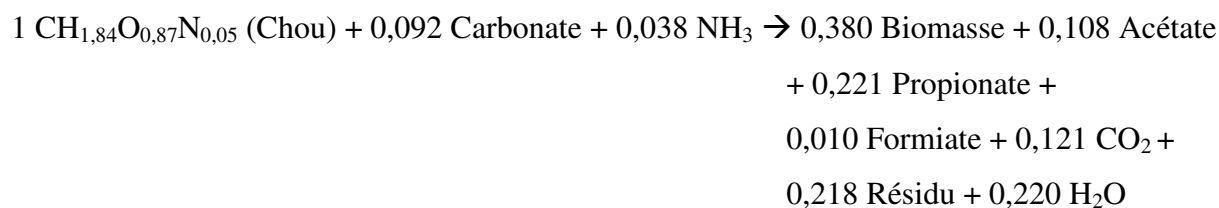
➤ Culture sur soja :



➤ Culture sur paille :



➤ Culture sur chou :



3.2 Simulation de la dégradation des végétaux séparément

En utilisant les équations stoechiométriques précédentes, la simulation de la dégradation a été réalisée à l'aide du logiciel «Anaerobic Waste Compartment Modelling and Simulation ». il n'est pas possible d'effectuer une analyse aussi précise que pour une culture sur glucose (chapitre III). Néanmoins le tableau IV.5 fournit la comparaison entre les valeurs expérimentales et calculées en fin de culture.

Concentration g/L		Expérimentales	Simulation
Substrat	Soja	47,8	47,7
	Paille	40	40
	Chou	18,8	18,7
Résidu	Soja	27,1	24,2
	Paille	28,1	27,8
	Chou	3,6	4,1
Biomasse	Soja	3	3,06
	Paille	4	5,5
	Chou	3	6,2
Acétate	Soja	3,8	3,8
	Paille	1,7	1,8
	Chou	2,1	2,1
Succinate	Soja	1,6	1,05
	Paille	2,9	2,1
	Chou	0	0
Butyrate	Soja	0	0
	Paille	1,6	1,6
	Chou	0	0
Propionate	Soja	4	4
	Paille	0	0
	Chou	3,6	3,5
Formiate	Soja	1,5	1,5
	Paille	0,4	0,4
	Chou	0,3	0,3
CO ₂	Soja	0,6	0,6
	Paille	0,05	0,06
	Chou	3,5	3,5

Tableau IV.5 : Comparaison des concentrations expérimentales et calculées pour les cultures sur les végétaux séparés obtenues en fin de culture

Les rendements de dégradation expérimentaux et ceux obtenus par la simulation sont très proches. En effet, les taux dégradation expérimentaux du soja, de la paille et du chou sont

respectivement de 43,2%, 29,7% et 80,6% et ceux obtenus par la simulation sont de 49,2%, 30,4% et 78,1%.

Cependant les temps de réaction expérimentaux sont différents de ceux obtenus par simulation. Pour la dégradation du soja, la production de succinate et de formiate cessent à 270 h de culture et celle du butyrate à 460 h de culture alors que la simulation prévoit que tous les métabolites soient produits de façon synchrone. Pour la dégradation du chou, le temps de réaction est de 250 h alors que le temps de réaction est de 210 h avec la simulation. Enfin, pour la dégradation de la paille, le temps de réaction est de 330 h alors que le temps de réaction est de 200 h avec la simulation. Les différences s'expliquent par l'absence d'équation d'inhibition introduite dans la simulation et par le fait que le programme de simulation considère que tout le substrat est présent en début de culture.

Par ailleurs, les constantes cinétiques utilisées dans la simulation sont celles qui ont été déterminées sur glucose. Il est tout à fait normal que des différences cinétiques subsistent puisque les limitations introduites par les phénomènes diffusionnels et l'attachement des bactéries aux particules de solide ne sont pas prises en compte.

3.3 Simulation de la dégradation du mélange de végétaux

Comme précédemment, la simulation de la dégradation a été réalisée à l'aide du logiciel « Anaerobic Waste Compartment Modelling and Simulation » et de l'équation stoechiométrique représentative de la dégradation du mélange de végétaux. Le tableau IV.6 fournit la comparaison entre les valeurs des concentrations expérimentales et calculées en fin de culture.

Les mêmes observations que sur glucose et que sur végétaux séparés peuvent être faites sur la comparaison des concentrations expérimentales et celles obtenues par la simulation. La seule différence importante se situe au niveau des concentrations en biomasse qui apparaissent plus élevées par la simulation. De plus, le temps de réaction est plus court avec la simulation. Avec la simulation, le temps de réaction est de 350 h alors que celui obtenu expérimentalement est de 1200 h. Cependant il apparaît que les concentrations en métabolites n'évoluent plus après

400 h sauf pour le butyrate ce qui explique l'écart observé sur cette variable. Nous pouvons en déduire que la majeure partie de la dégradation est terminée au bout de 400 h de culture.

Concentration g/L	Expérimentales	Simulation
Substrat	48,4	47,7
Résidu	14,5	13,9
Biomasse	4	14
Acétate	3,2	3,3
Succinate	2,3	2,4
Butyrate	7,5	8
Propionate	0,2	0,2
Formiate	0,5	0,6
CO₂	13,1	13,3

Tableau IV.6 : Comparaison des concentrations expérimentales et calculées pour les cultures sur le mélange de végétaux en fin de culture

Les concentrations en substrat et en résidu obtenues par la simulation permettent également une comparaison des dégradations. Le rendement de dégradation expérimental et celui obtenu par la simulation sont très proches. En effet, celui expérimental est de 70,2% et celui obtenu par la simulation est de 71%.

4 DISCUSSION

Dans cette étude, un réacteur anaérobie a été conçu avec les objectifs de rassembler de nouvelles informations sur la capacité *Fibrobacter succinogenes* à dégrader plusieurs substrats végétaux : paille de blé, chou, soja et un mélange (1/3 de chacun) de ces végétaux. Les différentes cultures montrent que le procédé utilisé est performant et que les techniques utilisées sont valides. En effet, les taux de recouvrement en carbone et azote sont supérieurs à 90 %, ce qui indique que la quasi totalité de ce qui est introduit dans le bioréacteur est retrouvé en fin de culture et donc que les méthodes expérimentales utilisées pour suivre le procédé sont valides. Les résultats obtenus pour des bilans de matière montrent également l'efficacité des suivis des cultures de *F.s.* et garantissent que les méthodes et les techniques employées pour déterminer les quantités consommées et produites sont applicables dans ce contexte expérimental.

L'efficacité de la dégradation reportée pour chacun des végétaux séparément montre des différences de cinétique de dégradation entre les substrats, des différences de dégradation totale mais aussi des variations de composition en constituants (hémicellulose, cellulose, et lignine). Le chou est dégradé le plus rapidement et avec une meilleure efficacité que les autres substrats (soja et paille). Ces résultats prouvent que la dégradation des différents substrats se produit différemment (Hu *et al.*, 2004) et que la composition du substrat en cellulose, hémicellulose et lignine est déterminant pour l'efficacité de *F.s.*. Deux raisons principales peuvent expliquer ces résultats : les proportions différentes en lignine des substrats et la taille des particules.

Le rapport entre le contenu en lignine et la dégradation apparente établis par Colling et Yokoyama (1980) est le premier facteur qui explique que la cinétique de dégradation de la paille est clairement plus lente et que la décélération du métabolisme de *F.s.* est plus importante lors de la dégradation de paille. En effet, les proportions en fibres et en lignine, quasi-identiques pour le soja et pour le chou (16 et 12% respectivement pour les fibres et 1% chacun pour la lignine), sont beaucoup plus importantes pour la paille (72% de fibres et 5% de lignine). C'est probablement la raison pour laquelle *F.s.* est plus efficace pour dégrader le chou et le soja que la paille. La structure complexe et fibreuse, avec une proportion élevée de lignine rend donc la paille très difficile à dégrader. La lignine est un hétéropolymère

phénolique ramifié, liée aux hémicelluloses aboutissant à un treillis dense (Angelidaki *et al.*, 2000) et conférant à la matrice fibreuse davantage de résistance mécanique, de rigidité et de complexité. Ceci implique donc que l'équipement enzymatique nécessaire pour dégrader l'hémicellulose liée la lignine doit être plus important que celui nécessaire à la dégradation de la cellulose ou de l'hémicellulose libre et conduit donc à observer une cinétique plus lente de dégradation. Dans un premier temps, les différentes cellulases dégradent les composés accessibles avec un rendement très élevé. Puis, les xylanases ou enzymes débranchantes (Forsberg *et al.*, 1994) permettent la séparation de l'hémicellulose et de la lignine du reste de la matrice et améliorent la dégradation de l'hémicellulose (Mc Dermid *et al.*, 1990). L'équipement enzymatique nécessaire est donc plus important pour dégrader la paille que le soja et le chou. Ainsi le chou et le soja sont dégradés plus rapidement et avec de meilleurs rendements que la paille en raison de leur différence de composition en cellulose, hémicellulose et lignine. Ceci peut également expliquer pourquoi les productions en AGV augmentent seulement à partir de 220 h sur la paille. Ce temps de latence semble être le temps nécessaire à *Fibrobacter succinogenes* pour produire les enzymes nécessaires pour débrancher l'hémicellulose de la lignine. Certains auteurs (McGavin *et al.*, 1990 ; Béra-Maillet *et al.*, 2000b) montrent que quelques endoglucanases sont exprimées de façon constitutive et que l'activité globale endoglucanase est augmentée en présence de polysaccharides insolubles.

Il existe peu d'informations quantitatives de la digestion de la cellulose par *Fibrobacter succinogenes*. Cependant Gardner *et al.* (1995) observent que chez *P. ruminicola*, la cellulose induit la synthèse de deux endoglucanases. De même, Wells et Russel (1994) montrent que *F.s.* croit rapidement sur cellulose et Mc Dermid (1990) constate que toutes les hydrolases identifiées chez *F.s.* semblent être synthétisées en présence de cellulose. La synthèse de certaines enzymes, telles que les endoglucanases, semble donc être induite par la cellulose ce qui suggère un mécanisme de régulation. Ces enzymes ont un niveau basal d'expression dans la cellule, lorsque le substrat est le glucose ou tout autre sucre simple et ce niveau augmente si le substrat est un sucre plus complexe tel que la cellulose. En conséquence, la cinétique de dégradation observée sur le mélange de ces substrats est différente des cinétiques individuelles et est la résultante des différentes cinétiques. En effet, le chou et le soja permettent des cinétiques de dégradation et de production plus rapides en début de fermentation puis la paille permet une cinétique plus tardive et plus lente. Ceci peut également expliquer la production plus importante de CO₂ lors de la culture sur le mélange que la somme des productions sur les végétaux séparément. En effet, certains végétaux

comme la paille provoquent la synthèse d'enzymes plus spécifiques, ces enzymes peuvent ensuite servir à dégrader les parties plus récalcitrantes du chou ou du soja et ainsi provoquer une dégradation plus efficace et une production en CO₂ plus importante.

Le deuxième point pouvant expliquer les différences de cinétique est la taille des particules qui sont beaucoup plus importantes pour la paille que pour les deux autres substrats. Weimer *et al.* (1990) et Maglione *et al.* (1997) ont considéré que l'aire, donc l'adhésion, était le facteur le plus important pour la digestion ruminale de la cellulose. Dans le rumen, les concentrations en sucres étant faibles, l'affinité pour le substrat est le facteur clé de la compétition bactérienne (Russell et Baldwin, 1979). De même Weimer (1996) conclut que la digestibilité de la cellulose n'est pas limitée par la population microbienne ou par son activité cellulolytique mais par l'accessibilité de la cellulose et de l'hémicellulose. De plus *F.s.* a besoin d'une adhérence très étroite avec les parois des cellules végétales (Fields *et al.*, 2000) pour dépolymériser la cellulose libérant des cellodextrines qui sont hydrolysées en glucose et cellobiose dans le périplasme. Enfin, la réduction de la taille permet un meilleur attachement des micro-organismes fibrolytiques, une meilleure colonisation et une meilleure production d'enzymes (Pan *et al.*, 2003). L'utilisation de plus petites particules pourrait probablement améliorer l'efficacité de la dégradation de la paille et raccourcir le temps de dégradation parce que la surface d'attachement de cellules serait augmentée.

Cependant, les plantes produisent beaucoup de produits secondaires pour se protéger des attaques des micro-organismes. Comme la lignine, ces produits influencent de façon importante leur digestibilité (Sliwinski *et al.*, 2002). La lignine semble donc être un inhibiteur de croissance en empêchant l'attachement des micro-organismes aux particules (Sliwinski *et al.*, 2002). Le facteur composition en fibres et le facteur adhésion, qui expliquent les différences de cinétiques entre les substrats, semblent donc être liés. L'adhésion, la taille des particules et la proportion en lignine ont donc un effet individuel et commun sur la dégradation des végétaux.

Lors des cultures sur le mélange de végétaux, il apparaît clairement que la dégradation se produit en deux étapes : une étape pendant laquelle un taux élevé de production de gaz est observé et une étape où la production cesse. Nous avons observé cette séparation en deux

phases pour la majorité des fermentations réalisées. Ceci peut être expliqué par la dégradation de deux types de substrats.

Pendant la première étape, les substrats plus facilement dégradables (sucres simples libérés par l'autoclave, la cellulose avec un accès simple...etc.) sont dégradés. En effet, Fondevila et Dehority (1994) ont proposé que l'augmentation de l'utilisation d'hémicellulose par *Fibrobacter succinogenes* A3c résulte d'une première solubilisation de l'hémicellulose du fourrage. De plus Barnes et Keller (2003) suggèrent que durant la conversion anaérobie par les bactéries du rumen, le substrat est d'abord hydrolysé en carbohydrates solubles puis fermenté en AGV. Ceci permettrait une cinétique très rapide de la dégradation en début de procédé et un métabolisme très actif des bactéries.

Pendant la deuxième étape, les fibres de cellulose et d'hémicellulose, fortement réticulées avec de la lignine, sont dégradées. La conversion du matériel lignicellulosique peut être gênée par sa structure comme la cristallinité de la cellulose et l'association de la cellulose et de l'hémicellulose avec la lignine (Camp *et al.*, 1988). De même la digestion anaérobie de la cellulose est affectée par plusieurs paramètres tels que la structure de la cellulose elle-même, la source de cellulose, le pH, la température...etc. (Hu *et al.*, 2004). Ceci est également confirmé par Barnes et Keller (2003) qui considèrent que la première hydrolyse est le facteur limitant de la fermentation des substrats insolubles, ce qui a pour effet de ralentir la dégradation et le métabolisme des bactéries. Ces différentes études montrent que la première dégradation des sucres simples provoque un métabolisme très actif de la bactérie provoquant ainsi des taux de productions élevés en métabolites et en CO₂. Ce métabolisme très actif se ralentit progressivement au cours d'une deuxième phase inhibé par la première.

Malgré les différences de cinétiques de dégradation, les cultures effectuées sur végétaux séparés ou en mélange montrent une grande efficacité de *Fibrobacter succinogenes* pour dégrader ces substrats, notamment le chou et le mélange, avec des productions en AGV importantes. Ces taux de production sont sensiblement différents de ceux observés précédemment (Greenwood *et al.*, 1978) pour la dégradation de substrats seuls par des bactéries du rumen. En effet, ces auteurs ont observé une production de 70% d'acétate, de 17% de propionate et de 9% de butyrate lorsque le substrat est de la paille de blé seule et une production de 45%, 40% et 12% respectivement sur du blé entier. Cependant dans les mêmes

conditions de culture que celles que nous avons étudiées, des taux de production similaires ont été observés par Séon *et al.* (2002). Il paraît donc évident que *Fibrobacter succinogenes* produit des AGV mais que leurs proportions varient selon les conditions expérimentales utilisées et selon les substrats utilisés.

Enfin, un des principaux objectifs d'un traitement anaérobie est de réduire la masse de végétaux pendant le processus. Le processus utilisé respecte cet objectif avec une réduction de 70% de la matière sèche pour le mélange et de 30 à 80% pour les substrats séparés. Le taux de dégradation le plus faible est celui de la paille. Camp *et al.* (1988) estiment que l'efficacité de conversion de la paille est inférieure à 45% par les bactéries du rumen, il semble donc normal que *F.s.* seul ne puisse pas dégrader la paille à plus de 30%.

Très peu de données sont disponibles sur l'efficacité de dégradation des végétaux que nous avons utilisé, par *F.s.* seul. Cependant pour d'autres substrats des rendements de dégradation de 55 à 70% sont observés par Kivaisi et Eliapenda (1995) sur le son de maïs et la bagasse (résudi fibreux de la canne à sucre) et par Hu et Yu (2005) sur le blé.

En comparant les rendements de dégradation à ceux obtenus avec d'autres techniques telles que la méthanogenèse ou le compostage, nous pouvons observer que les rendements de dégradation obtenus avec *F.s.* sont similaires à ceux observés en biométhanogenèse. Knol *et al.* (1978) obtiennent des taux de dégradation de 40 à 75% sur des déchets végétaux. De même des déchets végétaux tels que des pelures de pommes de terre, des fanes des carottes ou de la pulpe de pommes sont dégradés à des taux entre 20 et 90% par Raynal *et al.* (1998) en biométhanogenèse à deux étapes. Enfin, Bouallagui *et al.* (2002) utilisent un digesteur tubulaire pour dégrader des déchets de fruits et de végétaux et obtiennent des taux de dégradation de 58 à 75%. Cependant les taux de dégradation retrouvés en compostage par Kulcu et Yaldiz (2004) sur des déchets végétaux agricoles et en compostage ou vermicompostage par Tognetti *et al.* (2007) sur des déchets organiques sont inférieurs aux nôtres. En effet, ces auteurs obtiennent en compostage des taux de dégradation de 42 à 58% pour les déchets agricoles (Kulcu et Yaldiz, 2004) et de 25 à 44% pour les déchets organiques (Tognetti *et al.*, 2007) et en vermicompostage des taux de 7 à 20% pour les déchets organiques (Tognetti *et al.*, 2007).

5 CONCLUSIONS

- Les résultats obtenus montrent que les techniques utilisées pour suivre le procédé sur glucose sont applicables aux cultures sur végétaux.
- Les cinétiques de dégradation sont différentes selon le substrat dégradé et ceci peut être expliqué par une différence de composition en fibres et une différence de taille des particules des substrats, ce qui aboutit à la synthèse d'enzymes différentes selon le substrat.
- Lors de la dégradation du mélange de végétaux il apparaît que celle-ci s'effectue en deux étapes : une étape rapide où les sucres simples et les composés accessibles sont dégradés et une étape plus lente durant laquelle les substrats plus récalcitrants sont dégradés.
- Les rendements de dégradation obtenus sur les végétaux sont comparables à ceux obtenus en méthanogenèse utilisant des consortiums bactériens complexes et conduisant à la production de méthane.

CHAPITRE V

DEGRADATION DU SUBSTRAT MAP

1 INTRODUCTION

Les résultats précédents confirment l'efficacité de *Fibrobacter succinogenes* pour dégrader les végétaux. Cette efficacité permet donc de penser que le procédé utilisant *F.s.*, peut être utilisé pour la dégradation de déchets issus d'une première dégradation par méthanogenèse : le substrat MAP.

Les résidus du traitement par *F.s.* seront ensuite traités par une unité de traitement haute température / haute pression. Les échanges effectués entre les trois partenaires du contrat Microgravity Application Program (MAP) sont représentés sur la figure V.1.

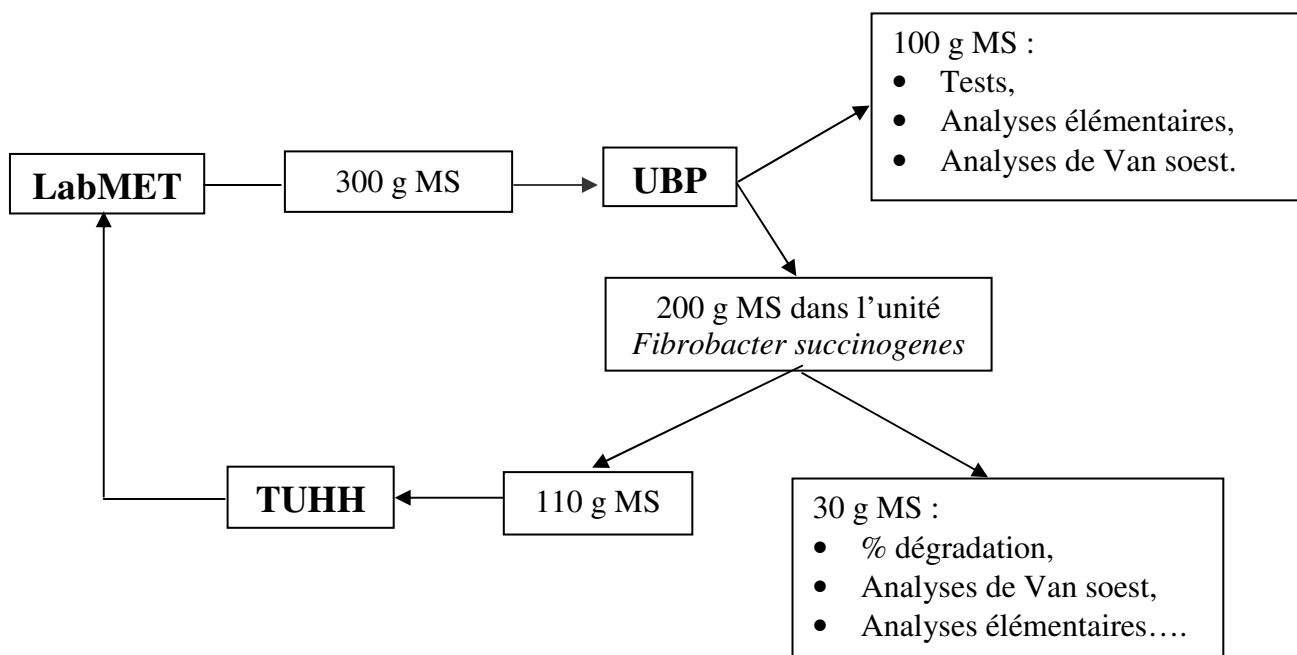


Figure V.1 : Echange de substrat entre les partenaires du projet MAP.

Des analyses de composition en fibres ont été effectuées sur les substrats avant la dégradation par *F.s.*. Ces analyses révèlent une grande proportion en fibres de ce substrat (89,4%) et surtout une proportion très importante en lignine (20,6%) par rapport aux proportions en fibres et en lignine du mélange de végétaux dégradé précédemment (chou, paille et tourteau de soja). Ceci suggère que la dégradation par *F.s.* de ce substrat sera moins efficace.

Des expériences préliminaires ont donc été effectuées afin d'examiner la capacité de *F.s.* à se développer sur le substrat MAP. Pour cela, des cultures en bouteilles (100 mL) sur le substrat MAP ont été comparées avec des cultures dans les mêmes conditions mais sur glucose. La croissance a été déterminée en mesurant par HPLC les productions en acétate et en succinate (Tableau V.1).

	Substrat MAP (1 g)	Glucose (1 g)
Acétate (g.L ⁻¹)	0,33	1,09
Succinate (g.L ⁻¹)	0,36	1,89

Tableau V.1 : Comparaison des productions en AGV dans des fioles scellées de 100 mL.

Après 100 h de culture, la production d'AGV sur le substrat MAP est inférieure à celle sur glucose. Cependant ces expériences laissent prévoir que des cultures de *F.s.* sur le substrat MAP doivent conduire à une dégradation appréciable de ce type de substrat.

2 RESULTATS EXPERIMENTAUX

2.1 Influence du temps de séjour du solide

L'influence du temps de séjour du solide pour le substrat MAP a été effectuée de la même façon qu'avec les végétaux pris séparément ou en mélange avec le RUSITEC. Le temps de séjour à partir duquel on obtient une dégradation maximale obtenu pour la dégradation du substrat MAP par *F.s.* est de 150 h (6 jours) avec 25,7% de dégradation (Figure V.2) pour des temps séjour inférieurs la dégradation n'est pas assez importante.

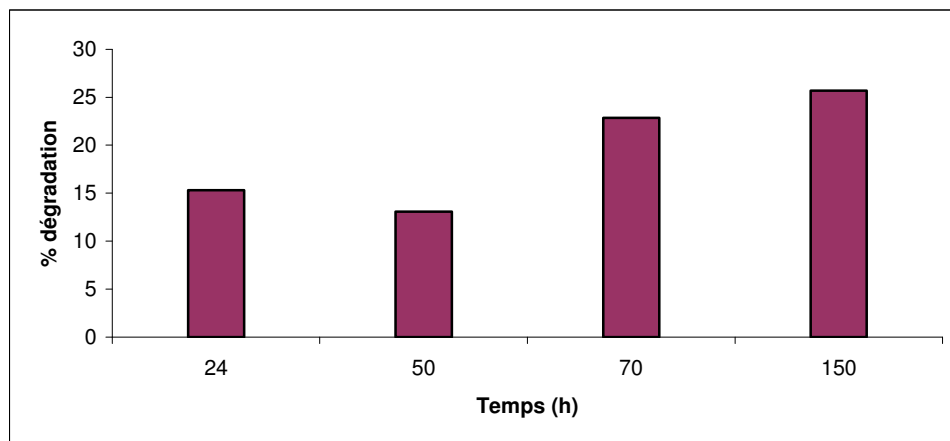


Figure V.2 : influence du temps de séjour sur la dégradation du substrat MAP.

Partant des ces résultats, deux techniques d'ajout du substrat solide ont été comparées :

- ajout en fed-batch,
- introduction d'une masse importante en début de culture.

2.2 Ajout du substrat solide en fed-batch

Selon les résultats en fioles scellées qui montrent des productions faibles en AGV (Tableau V.1), nous avons décidé de créer favoriser l'implantation du micro-organisme en début de culture par ajout de 8 g/l de glucose dans le milieu initial. Les cultures en batch suivantes ont été effectuées sur le substrat seul et le procédé a été maintenu pendant environ 660 heures

comprenant 6 additions de substrat (33 g chaque fois). Les additions de substrat ont été réalisées lors de l'arrêt de la production en CO_2 . Ceci correspond à une fréquence d'addition plus élevée (intervalles de temps plus courts) que ne le laissait prévoir l'étude précédente sur l'influence du temps de séjour.

Nous avons constaté que le pH a tendance à diminuer durant les premières heures de culture (comme pour la culture de référence sur glucose) ; après quoi le pH a tendance à augmenter ce qui a nécessité un apport manuel de HCl pour maintenir la valeur de consigne de 6,01.

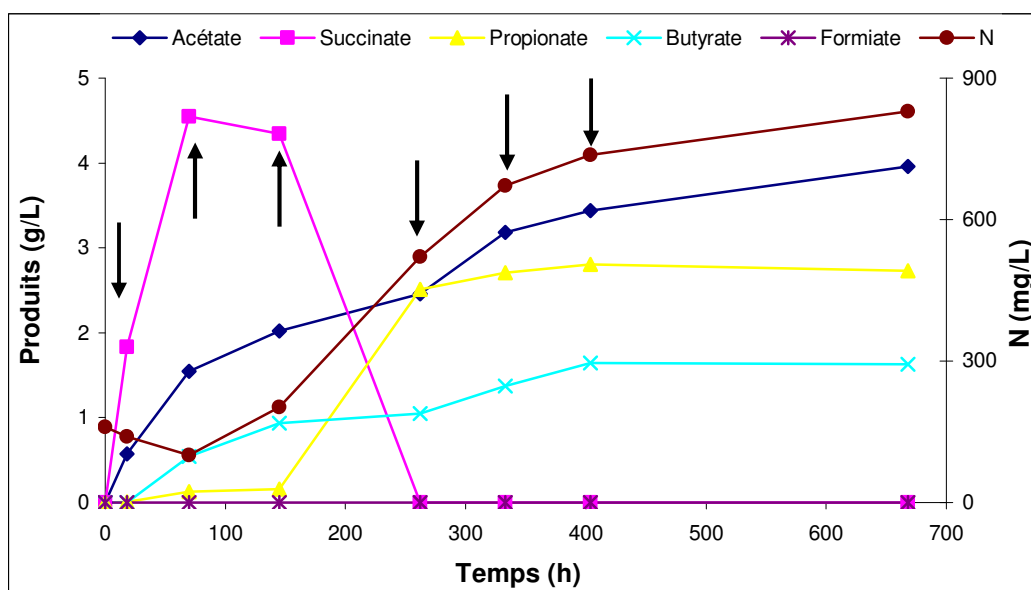


Figure V.3 : Evolution des concentrations en métabolites et en azote pendant la dégradation du substrat MAP, ➔ : Ajout de substrat.

La figure V.3 représente l'évolution des concentrations en métabolites pendant la dégradation. Les premières heures (18 h) de la culture sont caractéristiques du métabolisme de *Fibrobacter succinogenes* avec des productions principalement de succinate et d'acétate ($1,83 \text{ g.L}^{-1}$ et $0,57 \text{ g.L}^{-1}$). Ces productions d'acétate et de succinate sont dues à la présence du glucose dans les premières heures et la culture suit le profil caractéristique de la culture sur glucose (Chapitre III). Cependant ces productions restent importantes et rapides après 18 h de culture, en effet $2,72 \text{ g.L}^{-1}$ de succinate et $0,98 \text{ g.L}^{-1}$ d'acétate sont produits entre 18 et 70 h de culture. Une production de butyrate est observée ($0,55 \text{ g.L}^{-1}$) à partir de 18 h de culture. Après 262 h de culture, le succinate est consommé totalement et une production de propionate ($2,51 \text{ g.L}^{-1}$) est

observée. Les concentrations en butyrate et en propionate augmentent entre 262 h et 404 h de culture ($1,64 \text{ g.L}^{-1}$ et $2,80 \text{ g.L}^{-1}$) puis se stabilisent. La production en acétate augmente régulièrement tout au long de la culture pour atteindre $3,96 \text{ g.L}^{-1}$ en fin de culture. La production totale en AGV pendant la dégradation est de $8,32 \text{ g.L}^{-1}$. La production d'acétate est la plus importante et représente 47,6% de la production totale, le butyrate 19,6% et le propionate 32,8%.

Après une consommation de la source d'azote pendant les premières heures de la culture, une augmentation régulière de concentration est observée pendant toute la culture. La concentration en N-NH_3 finale est environ 800 mg.L^{-1} . L'augmentation du pH observée est probablement due à une concentration plus importante des ions d'ammonium dans le milieu.

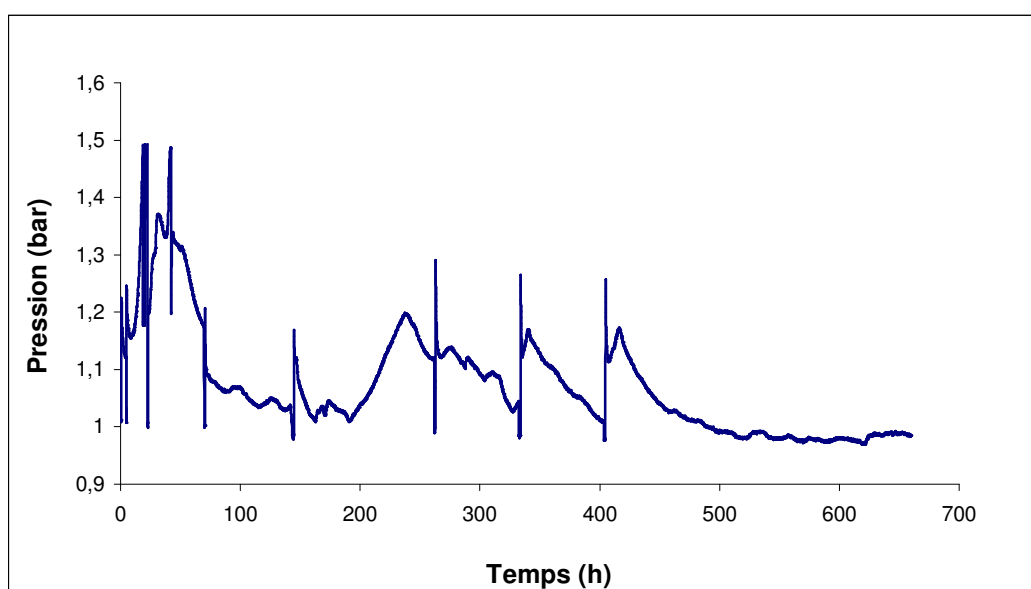


Figure V.4 : Evolution de la pression pendant la dégradation du substrat MAP.

La production de gaz (Figure V.4 et V.5) est importante durant le premier batch, production que l'on peut raisonnablement attribuer à la présence du glucose initial. Puis le gaz est produit plus lentement jusqu'à 400 h de culture. En effet pendant le premier batch 8,4 g de CO_2 sont produits. Les ajouts suivants ne permettent pas d'observer une production de CO_2 importante. L'augmentation de pression est uniquement due à la remise sous pression manuelle après chaque ajout. Ce profil peut être expliqué par le fait que dans le substrat MAP, moins de

particules facilement dégradables sont présents par rapport aux végétaux et donc la production en CO₂ est inférieure.

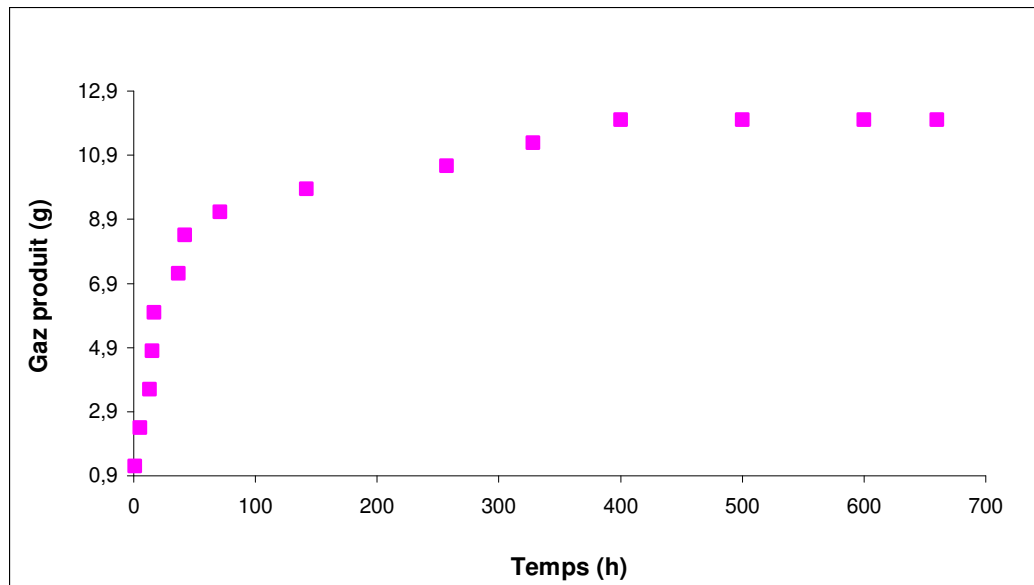


Figure V.5 : Evolution de la production en gaz pendant la dégradation du substrat MAP.

La composition en fibres a été déterminée par la méthode de Van Soest (1967). 50,9% des fibres totales ont été dégradées avec une dégradation plus importante pour l'hémicellulose (75,3%) (Tableau V.2). Ceci confirme la capacité et l'efficacité de cette bactérie à dégrader ce substrat malgré sa composition importante en fibres et en lignine.

	Fibres totales		Hémicellulose		Cellulose		Lignine	
	% MS	g	% MS	g	% MS	g	% MS	g
Substrat (200 g)	84,4	168,8	30,9	61,8	32,9	65,8	20,6	41,2
Résidu (140 g)	59,2	82,9	11,1	15,5	19,1	26,7	29	40,6
Dégradation (%)	50,9		75,3		59,4		1,5	

Tableau V.2 : Analyse de la composition en fibres par la méthode de Van Soest

Le rendement de la dégradation estimé est de 27%. Ceci confirme également la capacité de *Fibrobacter succinogenes* à dégrader un substrat qui a été traité par un consortium de bactéries méthanogènes.

Le taux de recouvrement du carbone est de 94,1%, ce qui confirme l'efficacité de contrôle et de la régulation du procédé de dégradation par *F.s.* en ce qui concerne l'élément carbone. De la même manière que pour le bilan carbone, les résultats obtenus pour le bilan azote (92,3%), confirment également l'efficacité de contrôle du procédé pour l'élément azote. D'après ces bilans 16,2% du carbone a été converti en AGV, 2,6% en CO₂ et 4,5% en biomasse.

2.3 Culture en batch

La culture en fed-batch présentée précédemment a permis de dégrader 200 g de substrat (6x33,3 g) avec un rendement de dégradation de 27% avec une vitesse volumique moyenne de dégradation de 0,29 gMS.L⁻¹.j⁻¹. Cependant la culture en fed-batch montre que les concentrations en métabolites n'évoluent plus après 262 h de culture. De plus vis à vis du substrat MAP, nous sommes confrontés à une difficulté en terme d'alimentation : quantité et fréquence. En effet, le projet MAP est une alternative au premier compartiment de MELiSSA et donc doit dégrader les déchets provenant de l'équipage. Il paraît donc difficilement imaginable que la quantité de déchets produits soit de 33 g tous les 6 jours (150 h), ce qui a été réalisé lors de la culture en fed-batch. Cette quantité de déchets sera plus importante, nous avons donc décidé d'ajouter tout le substrat en début de fermentation pour tester notre procédé sur une quantité plus importante et pour essayer d'obtenir un meilleur taux de dégradation.

De la même manière, 8 g.L⁻¹ de glucose ont été introduits initialement pour favoriser la croissance bactérienne en début de culture. Tout le substrat (200 g) est également introduit en début de culture. Le procédé a été maintenu pendant 325 h (deux temps de séjour) avec trois ouvertures du réacteur après la stabilisation de la production de CO₂ pour prélever et déterminer les productions de métabolites.

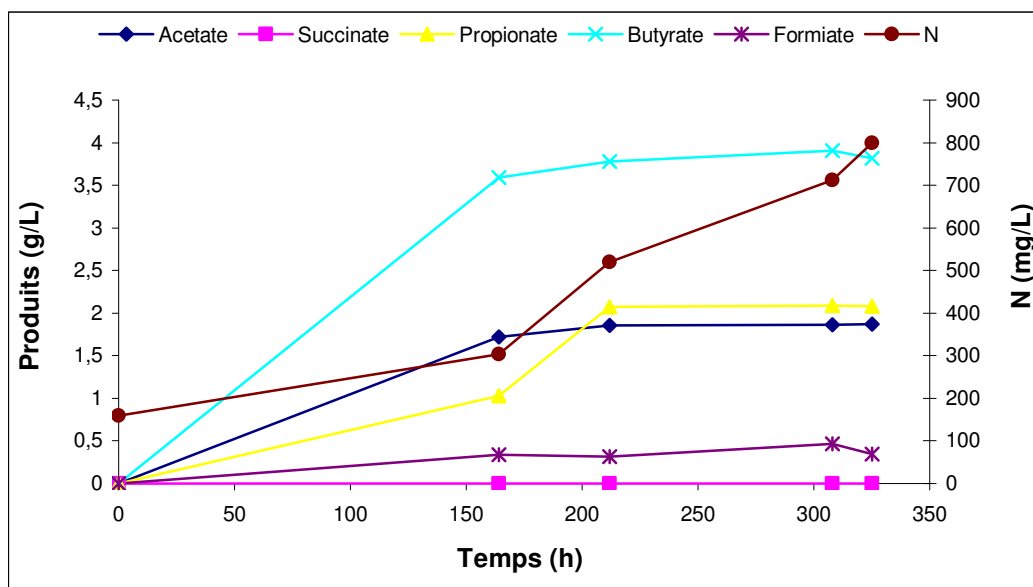


Figure V.6 : Evolution des concentrations en AGV et azote pendant la dégradation du substrat MAP.

La figure V.6 représente l'évolution des concentrations en métabolites durant la dégradation. Après 325 h de culture les concentrations en butyrate, en acétate et en propionate sont respectivement de $3,82 \text{ g.L}^{-1}$, $1,87 \text{ g.L}^{-1}$ et $2,08 \text{ g.L}^{-1}$. Le profil métabolique est semblable à la dégradation précédente en fed-batch avec une production totale d'AGV proche ($8,32 \text{ g.L}^{-1}$ en fed-batch et $7,77 \text{ g.L}^{-1}$ en batch). Cependant les proportions des AGV sont différentes. En effet, le butyrate représente la plus grande proportion : 49,2% de la production totale. De plus, aucun prélèvement n'a été effectué dans les premières heures de culture afin de préserver la pression dans le réacteur. De ce fait aucune production de succinate n'est observée comme pour la culture en fed-batch où les premières heures de la culture sont caractéristiques du métabolisme de *Fibrobacter succinogenes* avec la production principalement de succinate et d'acétate. La culture en fed-batch a permis de constater que le succinate est consommé par la suite pour la production d'autres AGV (butyrate et propionate). Nous pouvons supposer que le même phénomène s'est produit pendant cette culture. La concentration en N-NH_3 finale est environ de 800 mg.L^{-1} . La production N-NH_3 est semblable à ce qui a été observé pendant la culture précédente en fed-batch.

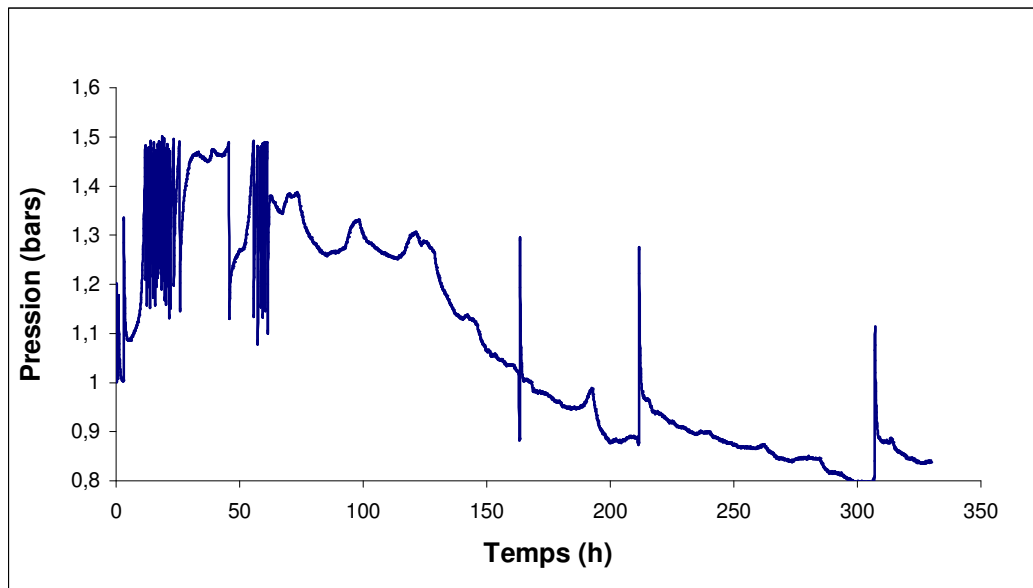


Figure V.7 : Evolution de la pression en CO₂ pendant la dégradation du substrat MAP.

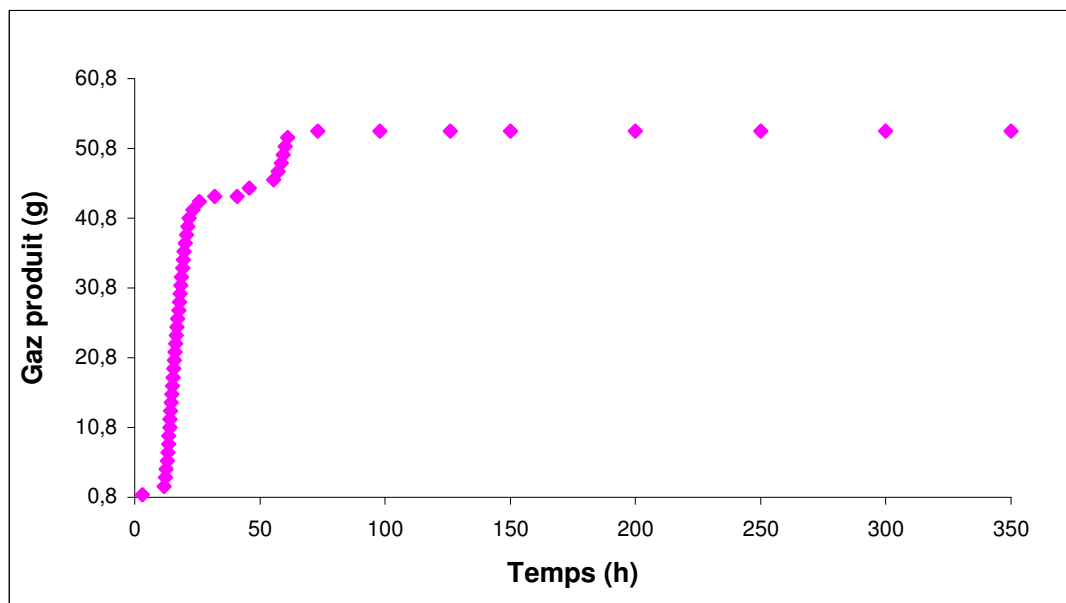


Figure V.8 : Evolution de la production de gaz pendant la dégradation du substrat MAP.

La production de CO₂ (Figure V.7 et V.8) est plus importante pendant cette dégradation. L'électrovanne s'est ouverte 44 fois libérant 30,8 L de CO₂, soit 53 g. La pression augmente pendant les 75 premières heures de culture et le profil est semblable à celui sur végétaux. En effet cette augmentation se fait en deux temps : une production élevée (42 g ou 0,56 g.h⁻¹) et

une production plus faible (9 g ou 0,26 L.h⁻¹). L'augmentation rapide après la fermeture du bioréacteur est provoquée par la fermentation du glucose et des composés plus facilement dégradables (les sucres simples libérés par l'autoclave). Cette dégradation permet un métabolisme très actif de *F.s.*. Puis, la dégradation des substrats récalcitrants induit une production de gaz plus lente. Après ces deux phases, il n'y a plus de CO₂ produit.

Le rendement de dégradation mesuré en fin de culture est de 32,2% avec 54,7% de dégradation des fibres totales, 62,6% de l'hémicellulose, 42,1% de la cellulose et 0,1% de la lignine (Tableau V.3).

	Fibres totales		Hémicellulose		Cellulose		Lignine	
	% MS	g	% MS	g	% MS	g	% MS	g
Substrat (200 g)	58,68	117,4	20,84	41,7	16,1	32,3	21,68	43,4
Résidu (135 g)	37,99	53,2	11,1	15,6	13,4	18,7	30,95	43,3
Dégradation (%)	54,7		62,6		42,1		0,1	

Tableau V.3 : Analyse de la composition en fibres par la méthode de Van Soest

Le taux de recouvrement du carbone est de 94,1% et de l'azote de 92,3%. Ces bilans montrent que 13,8% du carbone est utilisé pour produire des AGV, 13,6% pour le CO₂ et 4,5% pour la biomasse, le reste est constitué du résidu.

Un arrêt des productions est observé à partir de 150 h de culture qui est le temps de séjour maximal à partir duquel on n'observe plus de dégradation du substrat MAP. Cet arrêt est probablement dû à une inhibition par les métabolites (AGV). Afin d'éliminer ou de réduire cette inhibition un renouvellement du milieu de culture a été réalisé.

2.4 Renouvellement du milieu de culture

La culture précédente en batch permet de dégrader une plus grande quantité de substrat avec un meilleur rendement qu'une culture en fed-batch. En effet la culture en batch a permis d'augmenter le rendement de dégradation par rapport à la culture en fed-batch de 27 à 32,2% de dégradation avec une vitesse volumique moyenne de dégradation de 1,10 gMS.L⁻¹.j⁻¹. Cependant nous pouvons observer sur cette culture qu'après 150 h les productions en AGV

n'évoluent plus. Cet arrêt des productions peut s'expliquer de deux façon : soit il faut considérer qu'au bout de 150 h de fermentation tout le substrat dégradé par *F.s.* est épuisé ; soit l'arrêt de la dégradation est provoqué par un inhibiteur. Pour vérifier cette dernière hypothèse, nous avons décidé de renouveler le milieu de culture.

2.4.1 Expériences préliminaires sur glucose

Afin d'optimiser la technique de renouvellement du milieu, les premières cultures ont été effectuées sur glucose, car ce changement de milieu peut modifier les conditions de culture (pH, redox...) et perturber la croissance de *Fibrobacter succinogenes*.

Le procédé a été maintenu durant 1250 h incluant 16 additions de glucose (10-12 g.L⁻¹) dans une solution de N-NH₃ et deux changements de milieu. Le changement de milieu a été effectué après sédimentation de la biomasse et aspiration du surnageant. Pour cela, à 625 h de culture l'agitation a été arrêtée pendant 10 h afin de permettre à la biomasse de décanter, de même entre 1020 et 1030 h de culture. Après décantation, le milieu a été aspiré puis 3 L de milieu frais réduit a été ajouté.

La courbe de croissance (Figure V.9) montre une croissance maximale après 200 h de culture puis une diminution et une stabilisation de la croissance jusqu'au changement de milieu. Après le premier changement de milieu la concentration en biomasse est plus faible. Ce changement de milieu provoque une perte en biomasse. Cependant la croissance reprend rapidement et est maximale après 20 h dans ce nouveau milieu. Le même phénomène est observé après le deuxième changement de milieu.

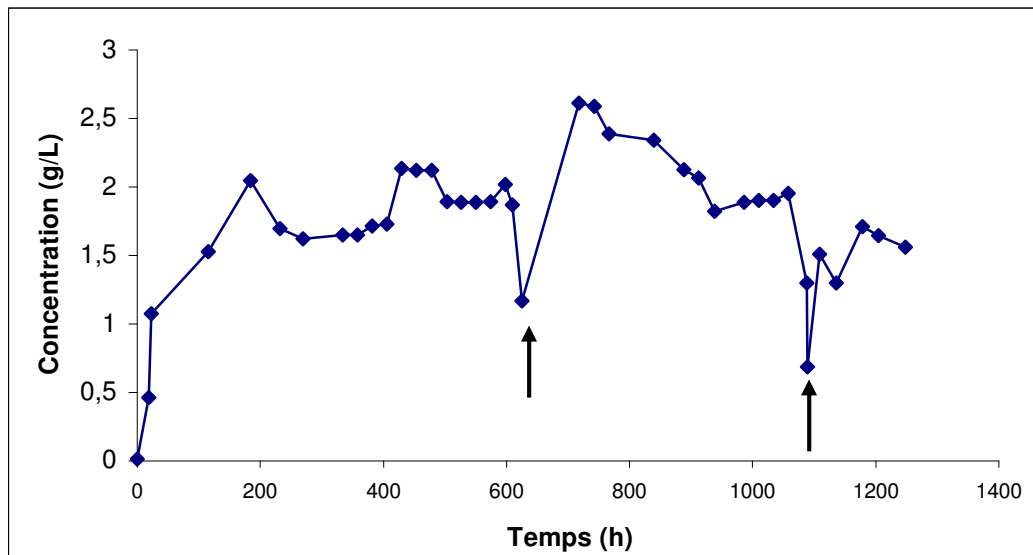


Figure V.9 : Suivi de la concentration en biomasse pendant la culture sur glucose avec renouvellement du milieu, ➔ : Renouvellement du milieu.

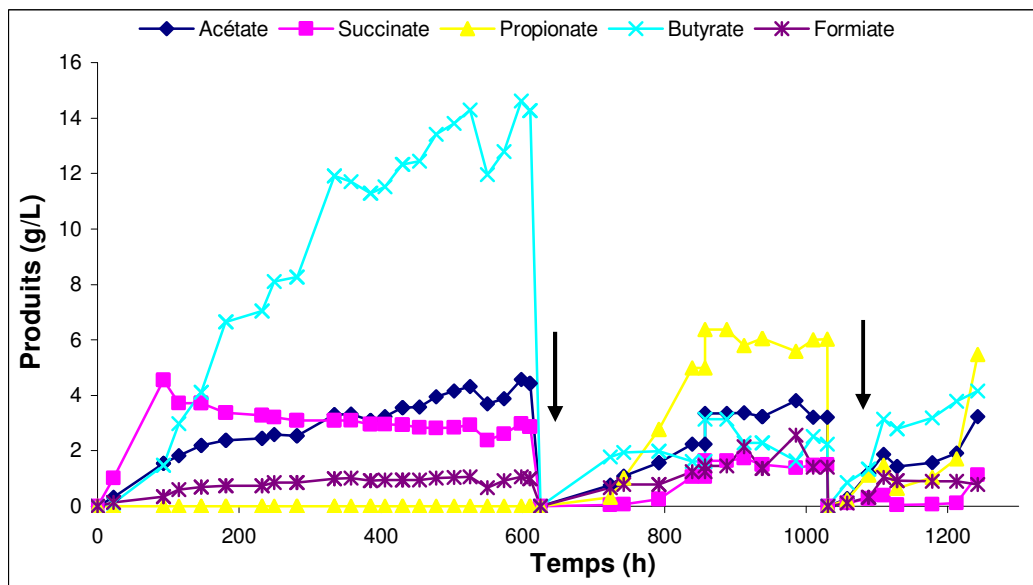


Figure V.10 : Evolution des concentrations en métabolites pendant la culture sur glucose avec renouvellement du milieu, ➔ : Renouvellement du milieu.

La figure V.9 représente l'évolution des concentrations en métabolites. A 625 h et 1020 h de culture, les concentrations sont ramenées à zéro car le milieu de culture est renouvelé.

Avec le premier milieu, la production de succinate est importante les 100 premières heures ($0,13 \text{ g.h}^{-1}$) puis reste stable ($2,8 \text{ g.L}^{-1}$). Les productions d'acétate et de butyrate augmentent tout au long de la culture avec le premier milieu cependant la concentration en butyrate (14 g.L^{-1}) est plus importante que la concentration en acétate ($4,44 \text{ g.L}^{-1}$) en fin de culture. Aucune production de propionate n'est observée.

Avec le second milieu, les productions d'acétate, de succinate, de butyrate, de formiate et de propionate sont observées pendant les 200 premières heures de culture avec le deuxième milieu respectivement $3,34 \text{ g.L}^{-1}$, $1,64 \text{ g.L}^{-1}$, $3,13 \text{ g.L}^{-1}$, $1,46 \text{ g.L}^{-1}$ et $6,37 \text{ g.L}^{-1}$. Puis ces productions se stabilisent ($3,22 \text{ g.L}^{-1}$, $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, $1,4 \text{ g.L}^{-1}$, $2,24 \text{ g.L}^{-1}$ et $6,03 \text{ g.L}^{-1}$) jusqu'au renouvellement de milieu. Après ce changement de milieu, le propionate apparaît dans le milieu de culture ce qui n'est pas le cas en début de culture. Cependant les concentrations obtenues avec le second milieu sont plus faibles que celle obtenues avec le premier. Ceci est probablement dû au nombre plus faible d'additions de glucose effectuées (8 pour le premier et 5 pour le deuxième) et au temps de culture (625 h contre 480 h).

Avec le troisième milieu, tous les métabolites sont produits au cours des 80 premières heures puis les concentrations se stabilisent. Après 218 h de culture dans ce nouveau milieu les concentrations en butyrate, acétate, succinate, propionate et formiate sont respectivement de $4,17 \text{ g.L}^{-1}$, $3,23 \text{ g.L}^{-1}$, $1,15 \text{ g.L}^{-1}$, $5,47 \text{ g.L}^{-1}$ et $0,78 \text{ g.L}^{-1}$.

La figure V.11 représente les productions cumulées des AGV avec les trois milieux. Cette représentation en productions cumulées permet de mieux apprécier l'efficacité des changements de milieu. Les changements de milieu ont permis de maintenir les vitesses de production du succinate à $0,004 \text{ g.h}^{-1}$, du butyrate à $0,016 \text{ g.h}^{-1}$ et d'augmenter les vitesses des productions en acétate de $0,007 \text{ g.h}^{-1}$ à $0,0077 \text{ g.h}^{-1}$, en propionate de 0 à $0,006 \text{ g.h}^{-1}$ et en formiate de $0,001 \text{ g.h}^{-1}$ à $0,003 \text{ g.h}^{-1}$, alors que ces vitesses sans renouvellement du milieu ont tendance à diminuer.

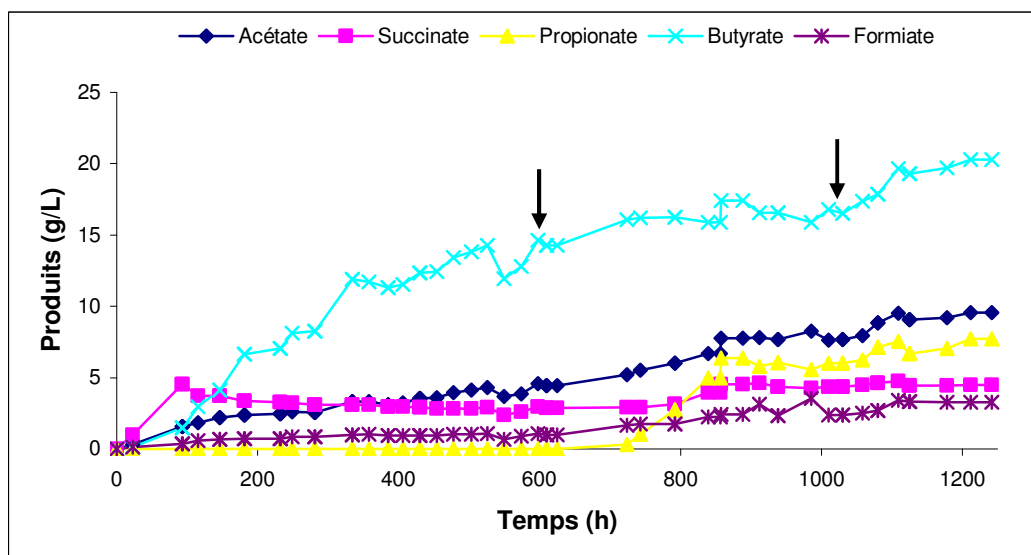


Figure V.11 : Evolution des concentrations en métabolites pendant la culture sur glucose avec renouvellement du milieu, ➔ : Renouvellement du milieu.

Les additions de glucose ont été effectuées en milieu liquide contenant la solution minérale II donc N-NH_3 . Cette addition de glucose en milieu liquide contenant N-NH_3 explique l'augmentation des concentrations en azote dans le milieu. Une diminution de la concentration en azote est observée dans les heures qui suivent chaque ajout de glucose. Ceci indique que *Fibrobacter succinogenes* utilise l'azote pour sa croissance.

L'évolution de la pression dans le réacteur pendant le processus de fermentation ainsi que la production de gaz produit sont représentées sur les figures V.12 et V.13. Sur la durée de la fermentation (1250 h), l'électrovanne s'est ouverte 322 fois donc 225,4 L de CO_2 ont été produits, soit 387,7 g.

Avec le premier milieu, l'électrovanne s'est ouverte 187 fois donc 130,9 L de CO_2 ont été produits ; soit 225,1 g.

Avec le deuxième milieu, l'électrovanne s'est ouverte 59 fois donc 41,3 L de CO_2 ont été produits, soit 71,0 g.

Avec le troisième milieu, l'électrovanne s'est ouverte 76 fois donc 53,2 L de CO_2 ont été produits, 91,5 g. Cette production augmente après chaque ajout de glucose.

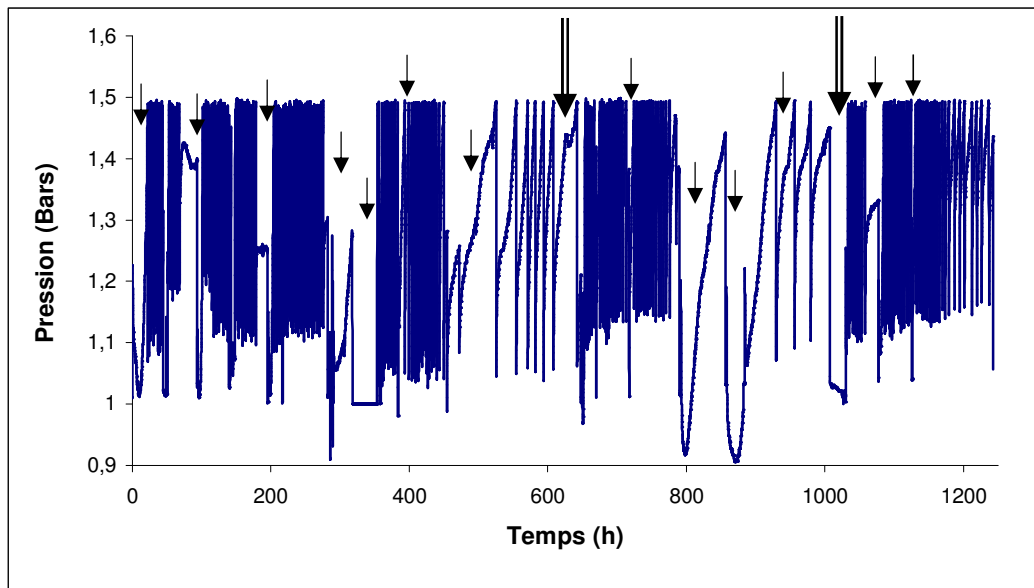


Figure V.12 : Evolution de la pression pendant la culture sur glucose avec renouvellement du milieu, ⇔ : Renouvellement du milieu, ➔ : Ajout de glucose.

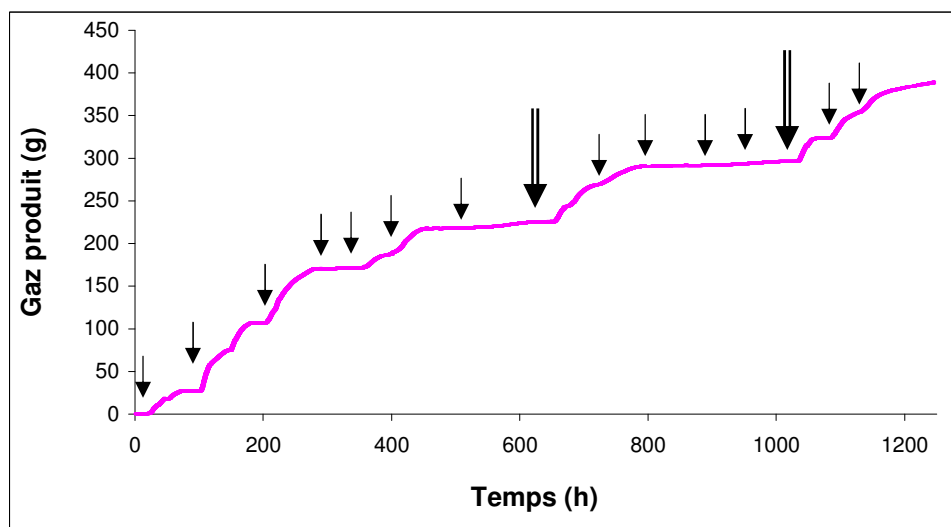
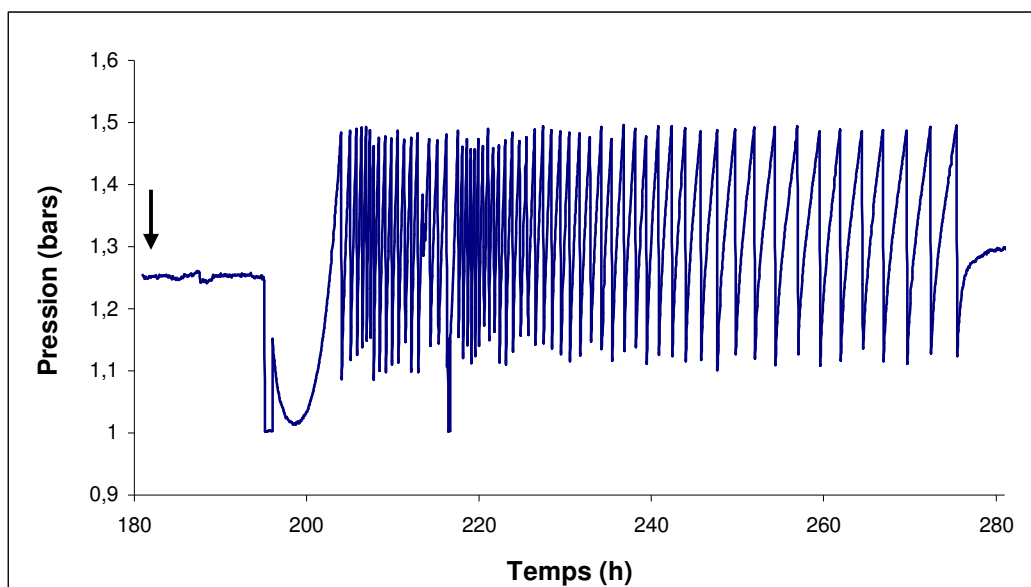


Figure V.13 : Evolution de production en gaz pendant la culture sur glucose avec renouvellement du milieu, ⇔ : Renouvellement du milieu, ➔ : Ajout de glucose



**Figure V.14 : Evolution de la pression et de la pression cumulée pendant un batch,
➔ : Ajout de glucose**

La figure V.14 détaille cette évolution sur un batch représentatif de toutes les additions de glucose que ce soit avec le premier, le deuxième ou le troisième milieu. La pression manuellement ajustée à 1,2 bars après chaque addition de glucose, diminue les premières heures à cause de l'équilibre chimique entre le CO_2 gaz et le CO_2 dissous. Ensuite la production de CO_2 commence et est très importante pendant 70 h. Après cette première phase, la production de gaz continue mais apparaît clairement moins importante jusqu'à l'addition suivante de glucose. Ce phénomène est observé sur les cultures en batch et en fed-batch sur glucose (Cf. chapitre III). Ceci montre qu'après chaque addition de glucose, quel que soit le milieu, une reprise de la croissance est observée. Cependant cette reprise de croissance est de plus en plus faible. Par conséquent chaque fois qu'une diminution de la production est observée, une addition de glucose est effectuée permettant ainsi de restaurer la croissance. Lorsque la reprise de croissance est plus faible, le milieu est changé.

Les figures V.15, 16 et 17 détaillent l'évolution de la pression sur chacun des milieux utilisés. D'après les résultats présentés, sur un batch, chaque fois que la production en gaz diminue du glucose est ajouté.

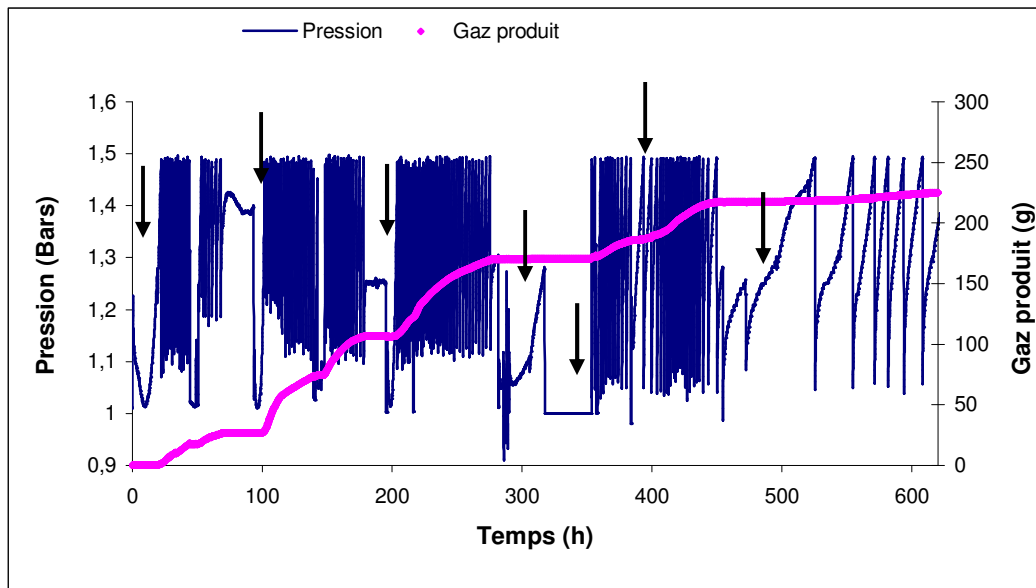


Figure V.15 : Evolution de la pression et de la pression cumulée avec le premier milieu (de 0 à 625 h), ➔ : Ajout de glucose

Avec ce premier milieu (Figure V.15), la production de CO_2 est très importante (225 g). Cependant après 8 additions de glucose la production diminue. En effet durant les premier, deuxième et troisième batchs, la pression a augmenté de environ $0,7 \text{ g.h}^{-1}$ par batch. Pendant le quatrième la pression a augmenté de $0,6 \text{ g.h}^{-1}$. Pendant le septième elle augmente de $0,2 \text{ g.h}^{-1}$ et pendant le dernier batch la pression n'a augmenté que de $0,05 \text{ g.h}^{-1}$. La diminution de production en gaz est un signe de la diminution de la croissance, nous avons donc décidé de renouveler le milieu de culture.

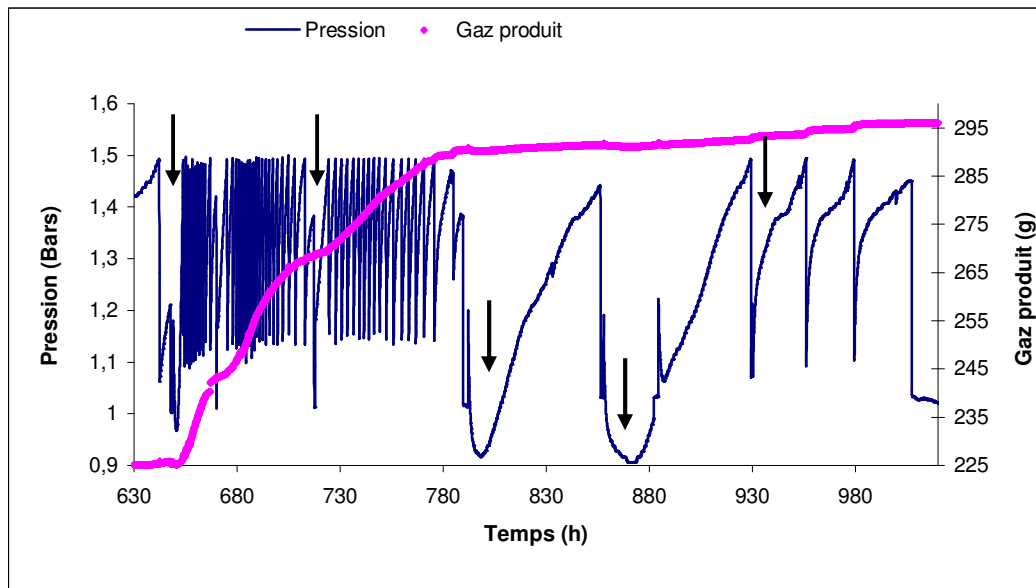


Figure V.16 : Evolution de la pression et de la pression cumulée avec le deuxième milieu (de 630 à 1020 h), ➔ : Ajout de glucose

L'objectif recherché en renouvelant le milieu de culture est de lever une inhibition éventuelle. La production (Figure V.16) de gaz, avec le second milieu, est très importante après la première addition de glucose. Cependant après 2 additions de glucose la production diminue. Après le renouvellement, la pression augmente de $0,5 \text{ g.h}^{-1}$ et après la dernière addition la pression n'a augmenté que de $0,02 \text{ g.h}^{-1}$. Cette diminution importante de la production en gaz conduit à renouveler le milieu.

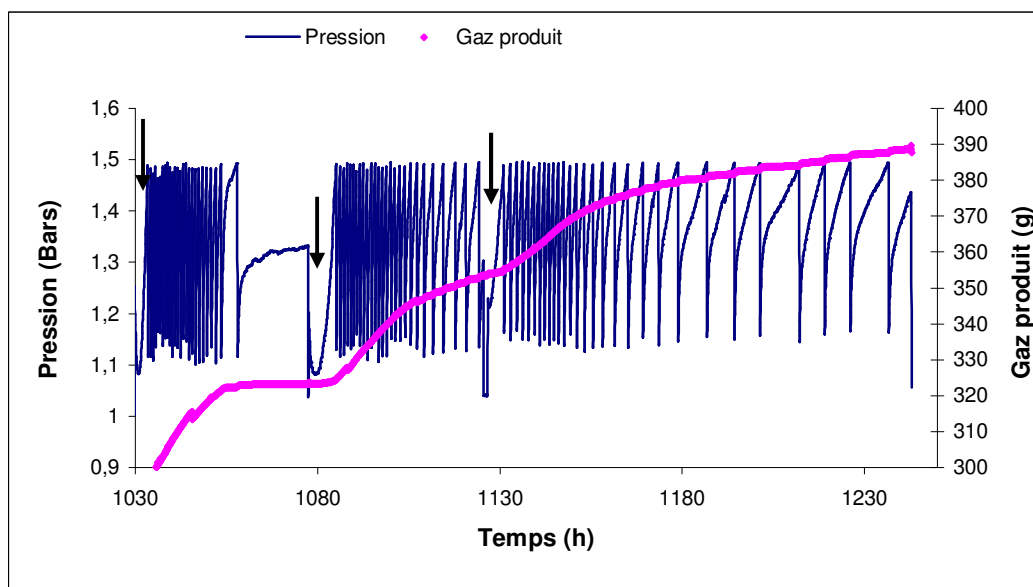


Figure V.17 : Evolution de la pression et de la pression cumulée avec le troisième milieu (de 1030 à 1250 h), ➔ : Ajout de glucose

Avec le troisième renouvellement, la production en gaz augmente (Figure V.17) de façon importante, puis diminue jusqu'à l'addition de glucose suivante et ceci pour les trois additions effectuées avec ce milieu. Cependant une diminution de la production est observée entre les batchs : une production de environ $0,6 \text{ g.h}^{-1}$ pour le premier et le deuxième batch et une production de $0,3 \text{ g.h}^{-1}$ pour le troisième.

Trois changements de milieu ont été effectués, cependant seul le premier et le troisième se ressemblent en ce qui concerne la production en CO_2 et la consommation en glucose. En effet la production de gaz augmente après chaque addition de glucose puis diminue progressivement jusqu'au nouvel ajout de glucose. De même les vitesses de consommation moyennes en glucose sont similaires ($0,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et $0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Pour le deuxième milieu, un problème est certainement survenu lors du changement de milieu car seule la première addition de glucose provoque une augmentation de la production en gaz et la vitesse de consommation du glucose est de $0,040 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Le taux de recouvrement du carbone est de 98% et de l'azote de 90% pour la durée totale de la fermentation, pour le calcul de ces bilans les pertes en biomasse, en AGV et en azote pendant les changements de milieu ont été prises en compte. 49,4% du carbone a été converti en AGV, 47,1% en CO₂ et 2,7% en biomasse.

De plus après les changements de milieu, un maintien de taux de productions en métabolites, en biomasse et en CO₂ est observé. Ceci confirme que le changement de milieu permet d'éliminer un inhibiteur de croissance. Nous déduisons que cette technique de culture peut être utilisée sur le substrat MAP afin d'essayer d'améliorer le taux de dégradation.

2.4.2 Dégradation du substrat MAP en utilisant une technique de renouvellement du milieu de culture

Le procédé a été maintenu durant 310 h en incluant un changement de milieu. 5 g.L⁻¹ de glucose ont été ajoutés au substrat solide en début de culture pour créer une population bactérienne. Le changement de milieu a été effectué après 150 h de culture de la même manière que sur glucose. À 150 h de culture, l'agitation a été arrêtée afin de permettre à la biomasse et aux particules solides non dégradées de décanter, puis le milieu a été aspiré et 3 L de milieu frais réduit ont été ajoutés sans source de carbone supplémentaire.

La figure V.18 représente l'évolution des concentrations en métabolites et en azote pendant la dégradation. La production totale en AGV est de 6,02 g.L⁻¹. La concentration N-NH₃ finale est environ 120 mg.L⁻¹. L'évolution du N-NH₃ est différente de celle qui a été observée pendant la culture en batch. En effet pendant les premières heures, l'azote est consommé quand *F.s.* se développe sur le glucose. Puis, pendant la dégradation, l'azote du substrat est libéré dans le milieu de culture en plus grande quantité que la quantité consommée par *F.s.*. Par conséquent, une augmentation de la concentration en azote est observée. Ceci est valable pour les deux milieux successifs.

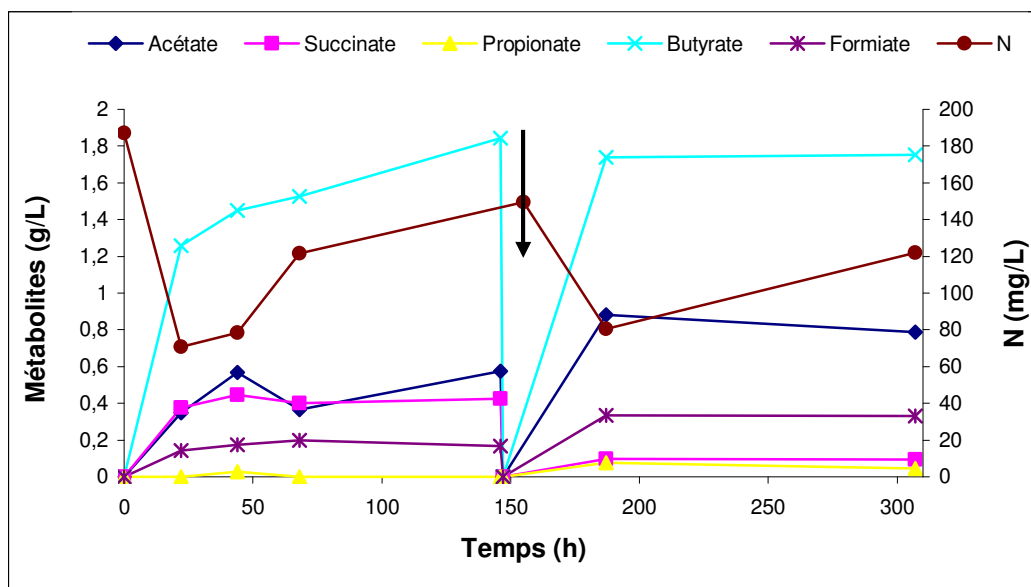


Figure V.18 : Evolution des concentrations en métabolites et en azote pendant la dégradation du substrat MAP avec renouvellement du milieu, ➔ : Renouvellement du milieu

Avec le premier milieu, les 25 premières heures sont caractéristiques de la croissance sur glucose de *Fibrobacter succinogenes* avec des productions d'acétate ($0,347 \text{ g.L}^{-1}$), de succinate ($0,377 \text{ g.L}^{-1}$) et de formiate ($0,144 \text{ g.L}^{-1}$). Une production importante de butyrate est également observée ($1,26 \text{ g.L}^{-1}$). Les productions en succinate ($0,43 \text{ g.L}^{-1}$) et formiate ($0,17 \text{ g.L}^{-1}$) se stabilisent après ce temps alors que les productions en acétate et en butyrate augmentent après 46 h de culture pour atteindre respectivement $0,576 \text{ g.L}^{-1}$ et $1,84 \text{ g.L}^{-1}$. Aucune production de propionate n'est observée.

Avec le deuxième milieu, le même profil de production est observé : une production pendant les 50 premières heures puis une stabilisation des productions. Après 150 heures avec le nouveau milieu, les productions en butyrate, en formiate, en acétate et en succinate sont respectivement $1,75 \text{ g.L}^{-1}$, $0,33 \text{ g.L}^{-1}$, $0,79 \text{ g.L}^{-1}$ et $0,09 \text{ g.L}^{-1}$. Une faible production en propionate ($0,04 \text{ g.L}^{-1}$) est également observée en fin de culture.

Le profil métabolique est semblable à celui observé en batch et avec des productions en AGV semblables. Ainsi le changement des milieux de culture n'affecte pas la croissance de

Fibrobacter succinogenes. En effet les productions d'AGV reprennent après le changement de milieu.

La figure V.19 représente les productions cumulées des AGV avec les deux milieux. Le changement de milieu a permis de maintenir les taux de production du succinate à $0,002 \text{ g.h}^{-1}$, du butyrate à $0,01 \text{ g.h}^{-1}$ et d'augmenter les taux de productions en acétate de $0,0039 \text{ g/h}$ à $0,0044 \text{ g.h}^{-1}$, en propionate de 0 à $0,0001 \text{ g.h}^{-1}$ et en formiate de $0,0012 \text{ g.h}^{-1}$ à $0,0016 \text{ g.h}^{-1}$. Alors que ces taux sans changement de milieu diminuent.

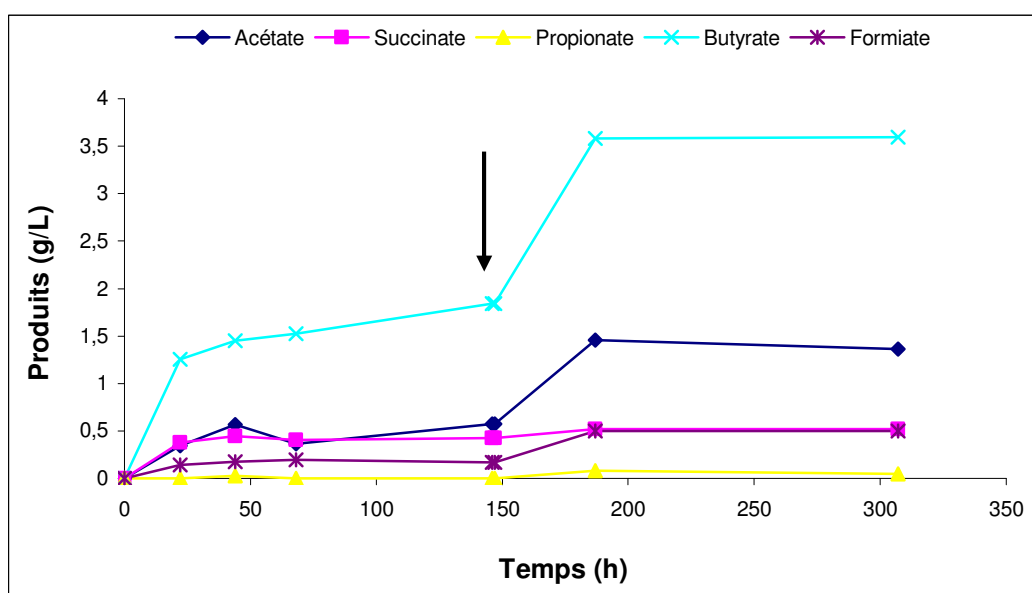


Figure V.19 : Evolution des concentrations en métabolites et en azote pendant la dégradation du substrat MAP avec renouvellement du milieu, ➔ : Renouvellement du milieu.

L'évolution de la pression dans le réacteur pendant la dégradation ainsi que la production en gaz sont représentées sur les figures V.20 et V.21. Sur la durée de la fermentation (310 h), l'électrovanne s'est ouverte 43 fois donc 30,1 L de CO_2 ont été produits ; soit 51,8 g.

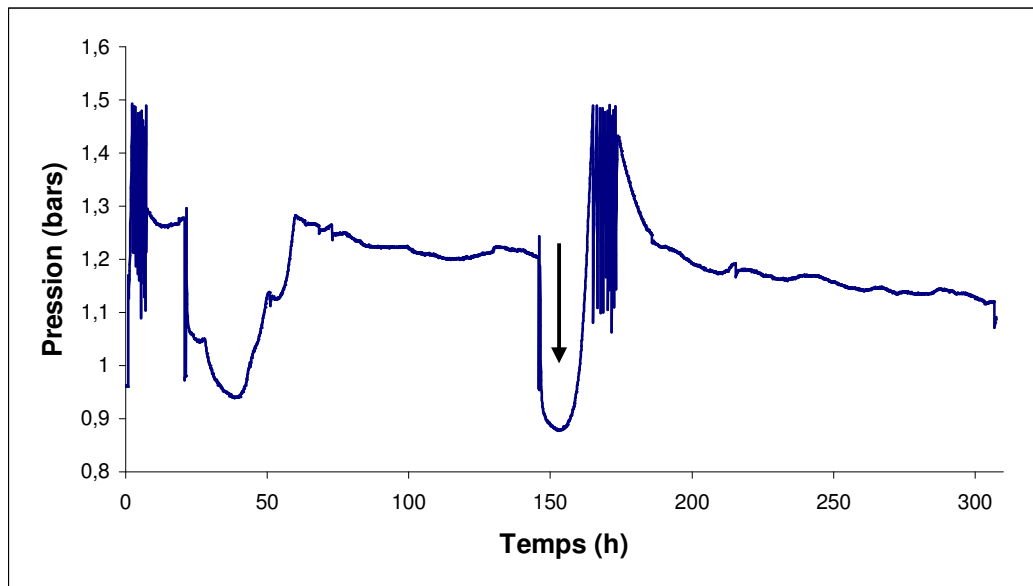


Figure V.20 : Evolution de la pression pendant la dégradation du substrat MAP avec renouvellement du milieu, ➔ : Renouvellement du milieu.

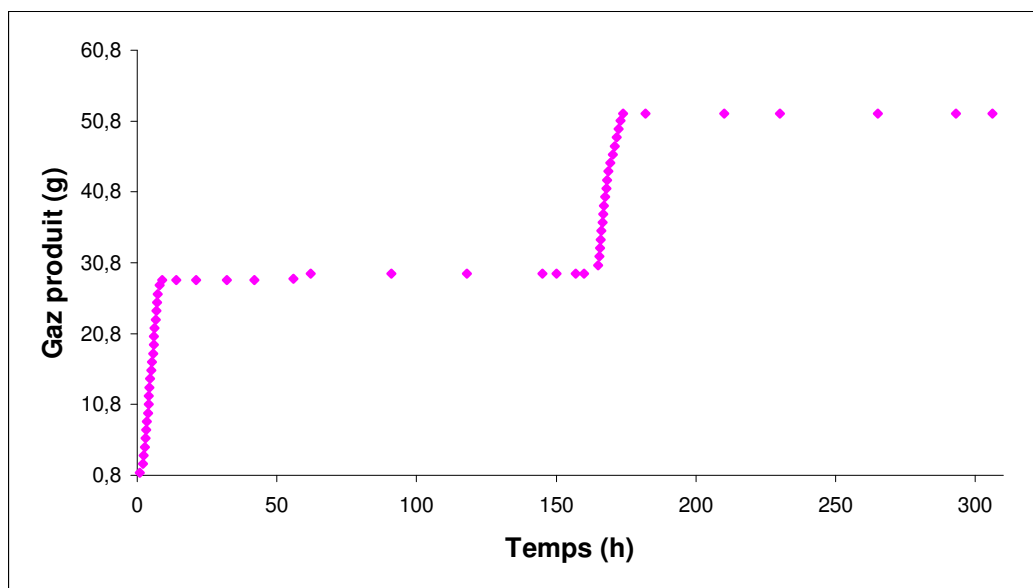


Figure V.21 : Evolution de production en gaz pendant la dégradation du substrat MAP avec renouvellement du milieu, ➔ : Renouvellement du milieu.

Avec le premier milieu, l'électrovanne s'est ouverte 24 fois donc 16,8 L de CO_2 ont été produits, soit 28,9 g. La pression augmente pendant les 10 premières heures de culture. Après cette phase, la production de CO_2 devient linéaire. Ainsi, deux phases sont observées : une

production élevée et une production faible. Ce phénomène a été observé sur les cultures en fed-batch et en batch : une première étape où les substrats plus facilement dégradables (sucres simples libérés par l'autoclave et la dégradation du glucose ajouté au début de la culture) sont dégradés, ce qui permet un métabolisme très actif de *Fibrobacter succinogenes*. Puis, pendant la deuxième étape, les substrats récalcitrants sont dégradés.

Avec le deuxième milieu, l'électrovanne s'est ouverte 19 fois donc 13,3 L de CO₂ ont été produits, soit 22,9 g. Le changement de milieu de culture permet de retrouver une production importante de CO₂ sans ajout de glucose. Cependant cette production diminue avec le temps et se stabilise. Ainsi nous pouvons penser que le changement de milieu de culture n'affecte pas la production de CO₂ sur le substrat MAP. Le changement de milieu modifie donc les rendements de dégradation en les améliorant.

Les compositions en fibres du substrat et du résidu ont été déterminées par la méthode de Van Soest (1967). Les proportions de fibres (Tableau V.4) sont différentes après la fermentation par *F.s.*. En effet 53,0% des fibres ont été dégradées, avec une dégradation plus importante de l'hémicellulose (69,9%) par rapport à la cellulose (41,9%). Ceci confirme l'efficacité de *F.s.* pour dégrader les fibres contenues dans le substrat MAP. Le pourcentage de dégradation estimé pour cette culture est de 36,4%. De plus les taux de recouvrement du carbone et de l'azote, supérieurs à 90%, montrent que 13,8% du carbone a été converti en AGV, 15,9% en CO₂ et 6% en biomasse.

	Fibres totales		Hémicellulose		Cellulose		Lignine	
	% MS	g	% MS	g	% MS	g	% MS	g
Substrat (160 g)	59,4	95	31,9	51,1	11,8	18,9	15,6	25
Résidu (111 g)	40,2	44,6	13,9	15,4	9,9	11,0	21,4	23,8
Dégradation (%)	53		69,9		41,9		4,8	

Tableau V.4 : Analyse de la composition en fibres par la méthode de Van Soest

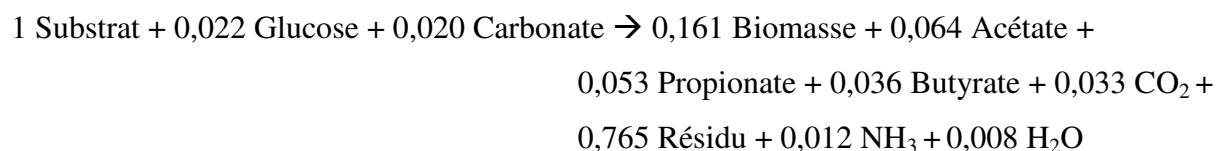
3 SIMULATION

Les corps présents dans la culture sont le substrat, le carbonate, le NH_3 , la biomasse, l'acétate, le propionate, le butyrate, le CO_2 , le résidu et H_2O . La formule C-molaire de chacun des corps est définie dans le tableau II.2 du chapitre matériels et méthodes. Par exemple la formule C-molaire du substrat est $\text{C}_1\text{H}_{1,66}\text{O}_{0,59}\text{N}_{0,09}$ et celle du résidu est $\text{C}_1\text{H}_{1,66}\text{O}_{0,53}\text{N}_{0,06}$.

Nous avons considéré une seule équation, qui à partir du substrat initial, aboutit au substrat résiduel et à l'ensemble des produits.

3.1 Ajout du substrat solide en fed-batch

En utilisant les rendements expérimentaux nécessaires, l'équation stoechiométrique globale qui traduit le processus est la suivante :



Les courbes de simulation permettent la détermination des concentrations finales et la comparaison entre les concentrations expérimentales et les concentrations obtenues par simulation (Tableau V.5). Une différence très faible est observée entre les concentrations obtenues à partir de la simulation et les concentrations expérimentales.

Concentration g.L ⁻¹	Expérimentales	Simulation
Substrat	50	50
Résidu	36,5	36
Biomasse	2,4	2,5
Acétate	3,9	3,9
Butyrate	0,9	0,9
Propionate	2,7	2,7
CO2	4,1	4,1

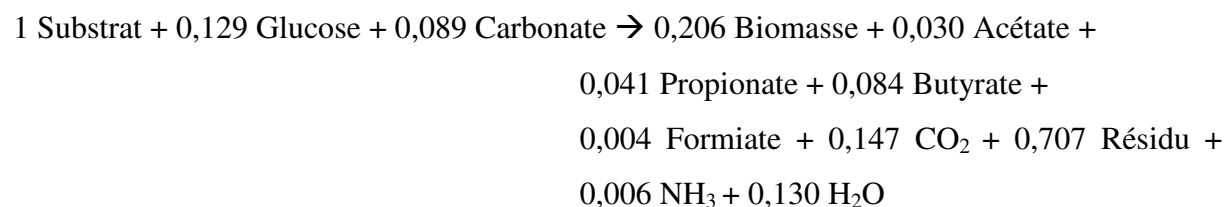
Tableau V.5 : Comparaison des concentrations finales expérimentales et des concentrations finales obtenues par la simulation

À partir des résultats obtenus avec la simulation, le taux de dégradation peut être calculé, celui-ci est de 28%. Ce taux est très proche de celui obtenu par l'expérimentation (27%). La simulation permet donc une bonne estimation des concentrations en métabolites et du taux de

dégradation. Cependant les variables cinétiques utilisées conduisent à une durée de dégradation de 110 h environ après une consommation totale du substrat dégradable. Ce temps de réaction est beaucoup plus court que celui observé expérimentalement. En effet, la culture expérimentale a été arrêtée après 660 heures comprenant 6 additions de substrat. Néanmoins, l'évolution des concentrations indique que les concentrations en métabolites n'évoluent quasiment plus après 262 heures de culture et ceci malgré l'ajout de substrat. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la simulation ne tient pas compte d'une inhibition ou d'une limitation probable par les métabolites eux-mêmes tandis que pendant la culture, il est évident que cette inhibition intervient. Par ailleurs les limitations diffusionnelles et le temps nécessaire à l'induction des dispositifs enzymatiques attaquant le substrat ne sont pas pris en compte.

3.2 Culture en batch

Après avoir déterminé les rendements nécessaires l'équation stoechiométrique obtenue est la suivante :



Les courbes de simulation permettent la détermination des concentrations finales et la comparaison entre les concentrations expérimentales et les concentrations obtenues par simulation (Tableau V.6).

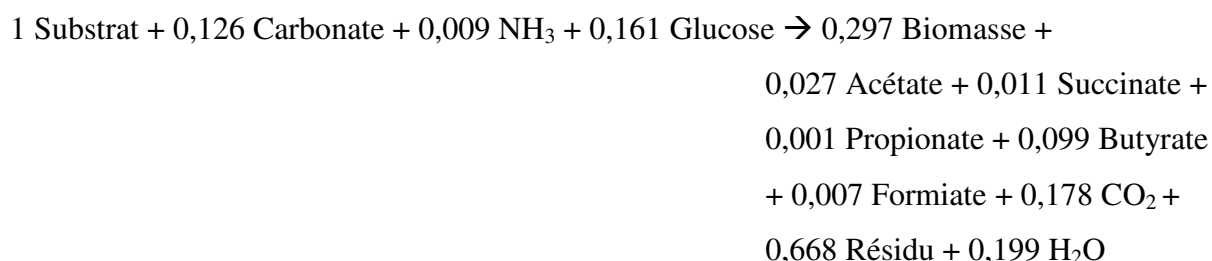
À partir des résultats obtenus avec la simulation, le taux de dégradation calculé est de 32,7% ce qui est très proche de celui obtenu par l'expérimentation (32,2%). Cette simulation permet également une bonne estimation des concentrations en métabolites et du taux de dégradation. Cependant, de la même façon que précédemment le temps de la réaction obtenu par la simulation est beaucoup plus court qu'expérimentalement. La même explication peut être avancée : la simulation ne tient pas compte d'une inhibition ou d'une limitation probable par les métabolites eux-mêmes.

Concentration g.L ⁻¹	Expérimentales	Simulation
Substrat	50	50
Résidu	33,9	33,6
Biomasse	2,4	2,58
Acétate	1,87	1,84
Butyrate	3,81	3,77
Propionate	2,08	2,02
Formiate	0,35	0,42
CO2	11,74	11,67

Tableau V.6 : Comparaison des concentrations finales expérimentales et des concentrations finales obtenues par la simulation.

3.3 Dégradation du substrat MAP en utilisant une technique de renouvellement du milieu de culture

Après avoir déterminé les rendements nécessaires, l'équation stoechiométrique suivante est obtenue :



A partir des courbes de simulation les concentrations finales en métabolites ont été déterminées et la comparaison entre les concentrations expérimentales et les concentrations obtenues par simulation (Tableau V.7) a été réalisée. Les concentrations obtenues à partir de la simulation sont très proches des concentrations expérimentales.

Le taux de dégradation obtenu à partir des résultats de la simulation est de 36% ce qui est très proche de celui obtenu par l'expérimentation (36,2%). Les concentrations en métabolites et le rendement de dégradation sont donc bien estimées par la simulation. De plus, le temps de réaction avec la simulation est très proche du temps expérimental. En effet, une stabilisation des productions est observée à 187 heures sur la culture expérimentale et à 170 h avec la simulation.

Concentration g.L ⁻¹	Expérimentales	Simulation
Substrat	40	40
Résidu	25,5	25,6
Biomasse	2,9	4
Acétate	1,4	1,3
Succinate	0,5	0,5
Butyrate	3,6	3,6
Propionate	0,05	0,06
Formiate	0,6	0,5
CO2	12,4	12,3

Tableau V.7 : Comparaison des concentrations finales expérimentales et des concentrations finales obtenues par la simulation.

3.4 Simulation de la boucle MAP

3.4.1 La boucle MAP

Les données des différents partenaires ont été collectées sur la première boucle MAP (culture en fed-batch pour l'unité *Fibrobacter*) afin d'effectuer les bilans azote et carbone de la boucle MAP et de simuler celle-ci.

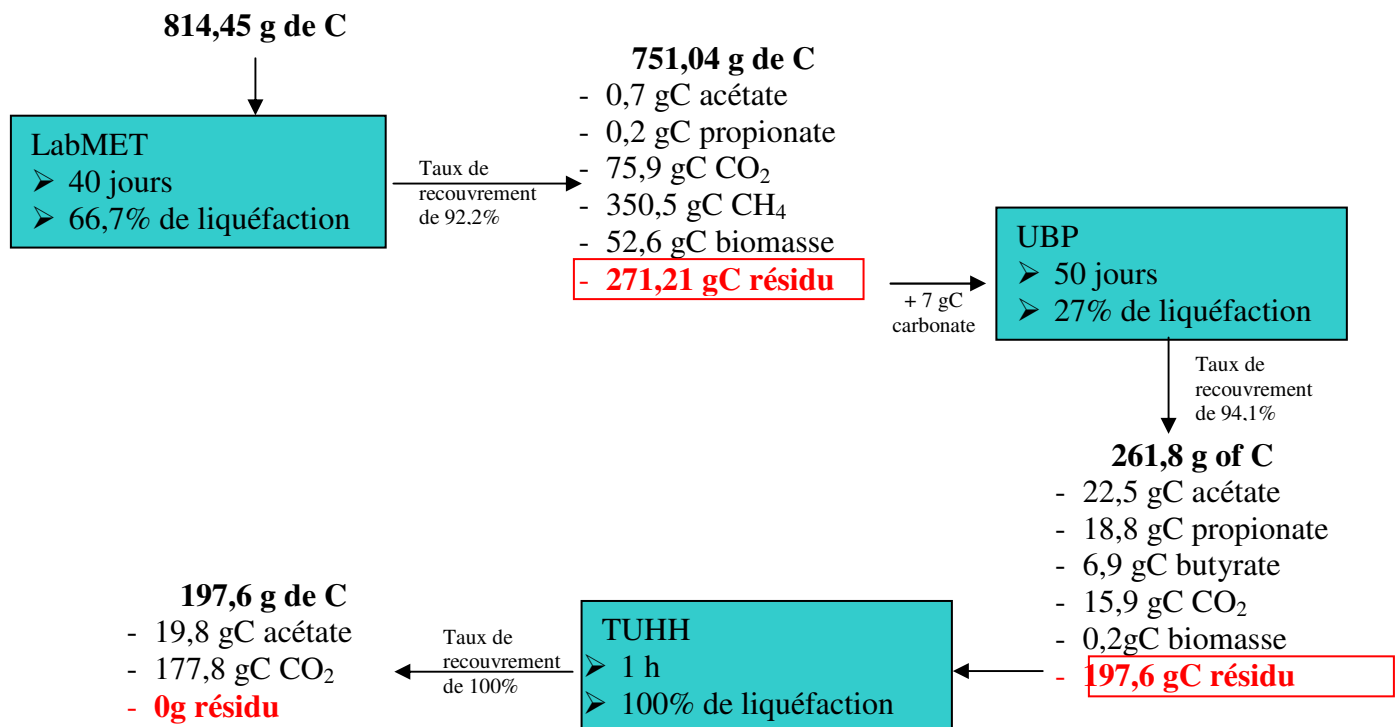


Figure V.22 : Carbone échangé entre les partenaires MAP.

Les échanges (g de carbone) entre les partenaires MAP sont représentés sur la figure V.22. Cette figure représente les échanges des substrats entre les partenaires. En effet, l'unité *Fibrobacter* par exemple, n'a dégradé expérimentalement que 200 g de solide et nous avons considéré que la totalité des résidus de la première unité a été dégradée par l'unité *Fibrobacter*. Toutes les variables ont donc été recalculées comme si elles avaient été traitées expérimentalement en totalité.

Les taux de recouvrement du carbone et de l'azote (Tableau V.8) sont respectivement de 92,4% et de 96,2% pour l'ensemble de la boucle MAP.

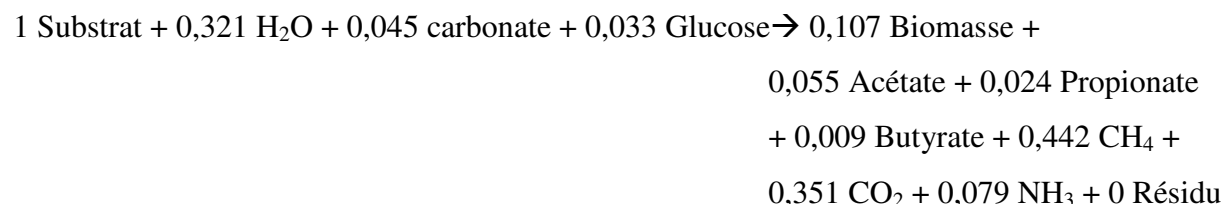
Bilan C	Entrées		Sorties					
Composés	Substrat	Carbonate	Acétate	Propionate	Butyrate	CO ₂	CH ₄	Biomasse
g de C	814,45	7	43	18,9	6,9	269,6	350,5	70,4
Total	821,5		759,3					
Bilan	92,4%							

Bilan N	Entrées		Sorties	
Composés	Substrat	NH ₃	Biomasse	NH ₃
g de N	70,14	20,5	9,4	77,7
Total	90,6		87,1	
Bilan	96,2%			

Tableau V.8 : Bilans C et N du processus global MAP.

3.4.2 Simulation

Après avoir déterminé les rendements nécessaires l'équation stoechiométrique suivante est obtenue :



Pour obtenir cette équation et donc les rendements molaires, nous avons additionné tous les métabolites produits au cours des trois procédés. De même les rendements ont été calculés par

rapport au substrat et non par rapport à la biomasse. Pour effectuer la simulation, nous avons considéré la boucle comme un seul compartiment.

La figure V.23 représente la boucle MAP comme un seul compartiment avec ses entrées et ses sorties.

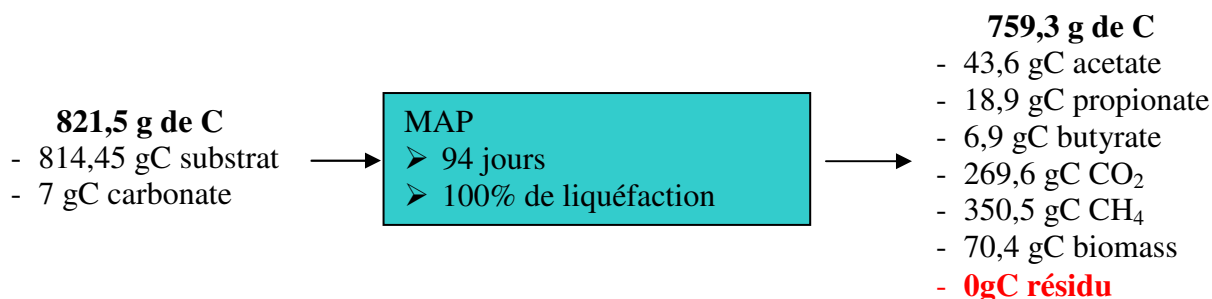


Figure V.23 : Carbone échangé pendant le processus MAP.

Les comparaisons entre les valeurs obtenues par la simulation et celles obtenues expérimentalement sont regroupées dans le tableau V.9.

Concentration g.L ⁻¹	Expérimentales	Simulation
Substrat	163,5	163,5
Résidu	0	0
Biomasse	13,4	15
Acétate	10,9	10,9
Butyrate	1,3	1,8
Propionate	3,9	3,6
CH₄	46,7	48,2
CO₂	101,05	101,81

Tableau V.9 : Comparaison des concentrations finales expérimentales et des concentrations finales obtenues par la simulation.

Le tableau V.9 fournit les valeurs des quantités (ramenées à un volume arbitraire de 5 L) après réconciliation des données par l'équation stoechiométrique précédente. On constate une bonne adéquation entre les valeurs simulées et les valeurs expérimentales. Ceci permet aussi de déterminer les rapports de quantités produites par la dégradation, le CO₂ constitue la part majoritaire.

4 DISCUSSION

Le fil conducteur des systèmes de support de vie biologiques (BLSS) est la récupération de la biomasse comestible, de l'eau, de l'oxygène, du CO₂ et des minéraux. Le compartiment plantes supérieures dans un BLSS sert principalement de source de nourriture, sachant que les plantes supérieures contribuent également à la régénération de l'atmosphère, de l'eau et fournissent un environnement semblable à celui de la Terre pour le confort psychologique de l'équipage. Malgré ces avantages, la présence d'un compartiment plantes supérieures contribue à l'augmentation de la masse des déchets solides à recycler dans le LSS (Life Support System). Ceci est une contrainte supplémentaire sachant que le système entier ne peut fonctionner que si la conversion de la biomasse non comestible, telle que les racines ou les feuilles, est effectuée. La majeure partie de ces déchets végétaux se compose de cellulose, d'hémicellulose et de lignine ce qui explique l'intérêt de développer des processus de conversion biologique.

Le choix du sous-ensemble approprié pour traitement de déchets dans les systèmes de support de vie clos (CELSS) est orienté par des critères de sélection objectifs. Des critères appropriés pour l'espace sont basés sur : la fiabilité, la robustesse, la sûreté, la réutilisation des éléments et la capacité à fournir de l'énergie. Les parties non comestibles des plantes, les déchets de transformation des produits alimentaires et les déchets humains doivent être réutilisés de telle manière que le CO₂ soit libéré dans l'atmosphère pour la croissance de plantes et que les minéraux soient récupérés pour entrer dans la composition des milieux de culture pour les plantes.

Dans le projet MELiSSA, la production de plantes supérieures est sensée fournir l'essentiel de l'approvisionnement alimentaire (Mergeay *et al.*, 1988). L'inconvénient principal d'une telle stratégie est qu'au moins 50% de la masse sèche des plantes produites est considéré comme non comestible et donc doit être réintroduite dans le système.

Beaucoup de technologies biologiques semblent être intéressantes pour dégrader efficacement les déchets végétaux. Cependant, elles doivent être capables de faire face à des applications spatiales où des contraintes de volume, de masse, d'oxygène, de sûreté et de fiabilité doivent être considérées, de sorte que les processus anaérobies sont utilisés préférentiellement. Les contraintes de volume et de masse, imposent de développer des technologies contrôlées.

Le premier compartiment de MELiSSA doit satisfaire ces contraintes avec une production d'AGV, d'ions ammonium, de gaz et une diminution du volume des déchets introduits.

Dans le procédé de méthanogenèse, les biopolymères des déchets végétaux sont convertis par une série de micro-organismes (Lissens et Verstraete, 2001) en acides gras et en CO_2 et CH_4 . Ceci présente l'avantage que les produits finaux de la fermentation, principalement des gaz, se séparent spontanément du milieu de fermentation. En conséquence, l'inhibition provoquée par ses produits est clairement inférieure à celle qui est observée actuellement dans le premier compartiment de MELiSSA développé actuellement. Les résultats obtenus avec la méthanogenèse montrent que 85% de la demande chimique d'oxygène (COD) est convertie en biogaz (60-65% de CH_4 et 35-40% de CO_2). L'efficacité de biodégradation du digesteur a atteint $2,6 \text{ g COD.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$, c'est-à-dire $1,6 \text{ g gMS.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$, menant à une production de biogaz de $1,6 \text{ L.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Le deuxième procédé consiste à dégrader les résidus du premier réacteur en acides gras volatils, évitant ainsi la production de méthane et réduisant au minimum la production de CO_2 pour améliorer la conversion du carbone en AGV. L'autre intérêt d'une telle alternative est d'utiliser l'efficacité de *F.s.* pour solubiliser les substrats végétaux.

Les différentes cultures effectuées sur le substrat MAP montrent la capacité de *F.s.* à dégrader un substrat issu d'une première dégradation par biométhanogenèse. Trois stratégies d'utilisation du substrat ont été testées. Au cours des cultures nous avons amélioré les rendements de dégradation. En effet, lors la première culture en fed-batch un rendement de dégradation de 27% a été obtenu. L'arrêt de la production d'AGV après 250 h de culture laisse supposer que la majeure partie de la dégradation est terminée. L'essai d'une stratégie plus rudimentaire en batch a eu pour effet d'augmenter le rendement de dégradation de 27% à 32%, mais a fait apparaître une inhibition par les produits. Pour éliminer cette inhibition le milieu de culture liquide a été renouvelé. Ceci eu pour effet de maintenir la quantité de métabolites produits tout en améliorant la production de CO_2 et la vitesse de dégradation (36,4%) avec une vitesse volumique moyenne de dégradation de $1,16 \text{ gMS.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Par conséquent, ce procédé présente effectivement des potentialités intéressantes pour le traitement des végétaux, sachant que les vitesses spécifiques pourraient être sensiblement augmentées en modifiant les vitesses d'entrée du substrat frais.

5 CONCLUSIONS

Deux conclusions à cette étude peuvent être tirées :

- *F.s.* est une bactérie qui possède un équipement enzymatique suffisamment performant pour compléter de façon très significative la dégradation des déchets végétaux ayant subi au préalable une dégradation par méthanogenèse,
- les travaux sur la stratégie d'alimentation du substrat solide et sur le renouvellement du milieu liquide permettent d'augmenter nettement le taux de dégradation de (27% à 36%).

Si pour toutes les expériences que nous avons réalisées nous avons été en mesure de développer une approche stoechiométrique, qui prend en compte pour construction les bilans de conservation en éléments, nous n'avons pas été en mesure :

- de fournir une modélisation cinétique complète incluant la prise en compte des phénomènes d'inhibition, d'induction d'enzymes...etc.
- de donner les interprétations métaboliques qui expliquent les différentes phases de production de métabolites et de dégradation des substrats.

CHAPITRE VI

RECHERCHE DE CONTAMINANTS

1 INTRODUCTION

Fibrobacter succinogenes S85 cultivée en réacteur anaérobie de 5 L, permet de dégrader les déchets végétaux efficacement. Comme ceci a été montré dans le chapitre III cette bactérie produit habituellement du succinate, de l'acétate, du formiate et du CO₂. Dans les cultures effectuées nous avons constaté que, du butyrate et du propionate sont produits parfois en quantité importante.

Deux hypothèses sont alors possibles pour expliquer cette production de butyrate et de propionate. La première hypothèse serait d'envisager un changement de métabolisme de *Fibrobacter succinogenes* et la deuxième serait la présence d'une ou plusieurs autres bactéries entrant alors en symbiose avec *Fibrobacter succinogenes* en réacteur.

La première hypothèse est difficile à mettre en avant compte tenu des données bibliographiques existantes. La deuxième hypothèse a été investiguée par plusieurs moyens.

Dans un premier temps nous avons supposé que la contamination provenait de la culture pure. La souche a donc été changée (commande à l'ATCC), mais aucun changement n'a été observé. Ensuite nous avons supposé que la contamination provenait soit du réacteur soit des déchets végétaux. Les déchets végétaux ont donc été mis dans les mêmes conditions de cultures mais sans inoculation de *Fibrobacter succinogenes* mais aucun métabolite n'a été produit. De plus, la production de butyrate (Chapitre III-réacteur 2) est également observée dans les cultures sur glucose en réacteur donc la contamination ne provient pas des végétaux. L'ensemble des ces données expérimentales ne permet pas de conclure quant à la présence d'un ou de plusieurs contaminants qui auraient besoin de certains métabolites de *Fibrobacter succinogenes* pour se développer. Nous avons donc cherché à identifier les bactéries présentes dans le réacteur au cours de nos cultures par des techniques de biologie moléculaire utilisées pour tester le premier compartiment de la boucle MELiSSA (Hendrickx *et al.*, 2003)

2 RESULTATS EXPERIMENTAUX

2.1 Identification globale des espèces présentes

Les prélèvements de réacteur ont été mis en culture sur les différents milieux liquides : 869, 284 glucose, 284 succinate, sistrom glucose et sistrom succinate ont été utilisés à 39°C en aérobie et en anaérobie. L'emploi de différents milieux avec différentes sources de carbone permet de discriminer certaines bactéries par rapport à d'autres. Les résultats des cultures sont présentés dans le tableau VI.1.

	Milieux	Fs pure	Culture sur glucose	Cultures sur paille	Culture sur le substrat Labmet	Culture sur le mélange de végétaux
Aérobie	869	+	+	+	+	+
	284 glc	+	-	-	-	-
	284 succ	-	-	-	-	-
	Sis glc	+	-	-	+	+
	Sis succ	-	-	+	+	-
Anaérobie	869	++	+	+	+	+
	284 glc	-	+	-	-	+
	284 succ	-	-	-	-	-
	Sis glc	+	+	+	-	+
	Sis succ	-	-	+	+	+

Tableau VI.1 : Résultats des repiquages en milieux liquides des prélèvements de réacteurs, + croissance, - pas de croissance.

Plusieurs choses sont à noter : tout d'abord une croissance est observée pour certains milieux en aérobie ce qui ne devrait pas être observé si *Fibrobacter succinogenes* était la seule bactérie présente. La deuxième chose intéressante à observer est une croissance dans certains des milieux contenant comme seule source de carbone le succinate (+).

Les extractions d'ADN ont été effectuées selon la méthode Fastprep décrite dans la partie « matériels et méthodes », sur les milieux liquides. Toutes les concentrations ont été déterminées par spectrophotométrie à 260 nm. De même la pureté de l'ADN extrait est vérifiée par le ratio 260/280 qui doit se situer à 1,80 et le ratio 230/260 qui doit se situer entre

1,8 et 2,2 pour que l'ADN soit considéré comme pur. Par conséquent, seules les extractions d'ADN dont le ratio 260/280 est supérieur à 1,80 ont été utilisées.

Dans un premier temps, des PCR avec des amorces spécifiques de groupe ont été réalisées afin de centrer les recherches sur les contaminants, mais aucune amplification n'a été obtenue que ce soit sur les contrôles positifs ou sur les échantillons. C'est pour cela que nous avons décidé d'abandonner cette stratégie et d'utiliser des amorces universelles qui ne doivent pas amplifier *Fibrobacter succinogenes* : Univ927f / Univ1492r et Univ927f / EUB515r. Une amplification est observée pour un grand nombre d'échantillons avec les couples d'amorces universelles (Figure VI.1).

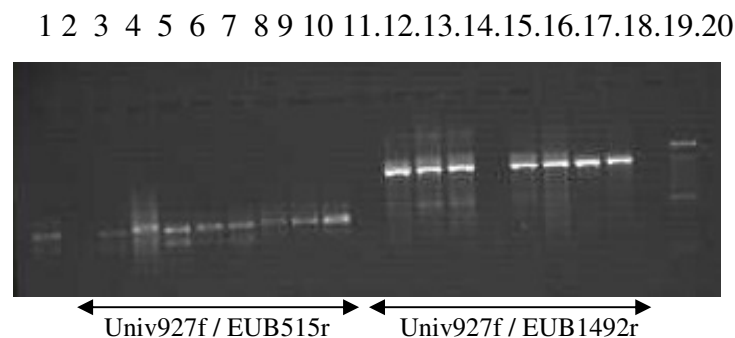


Figure VI.1 : Gel d'agarose obtenu avec les amplicons d'ADN provenant des cultures liquides.

Certains des échantillons ne sont pas amplifiés. Il s'agit des échantillons déposés dans le puit 2, 11, 15 et 19. Ces échantillons correspondent à des cultures effectuées à partir de *Fibrobacter succinogenes* en culture pure (sur milieu de repiquage). Ces résultats ne permettent pas l'identification certaine de contaminants. Nous avons donc décidé d'utiliser une autre technique d'analyse : la DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis).

2.2 Analyse de la diversité microbienne des prélèvements

Les extractions d'ADN ont été effectuées selon la méthode fastprep décrite dans la partie matériel et méthodes, directement sur les prélèvements de réacteur. De la même manière que précédemment, seules les extractions d'ADN dont le ratio 260/280 est supérieur à 1,80 ont été utilisées.

Les couples d'amorces ont été choisis de telle façon que certains couples (tel que 63fCG / EUB338r) ne doivent pas amplifier *Fibrobacter succinogenes* et d'autres couples (tel que 9-27fGC / EUB515r) qui doivent amplifier *Fibrobacter succinogenes* et des couples d'amorces universelles. Il devrait donc ainsi être possible de situer la présence d'autres bactéries par rapport à celle de *Fibrobacter succinogenes*.

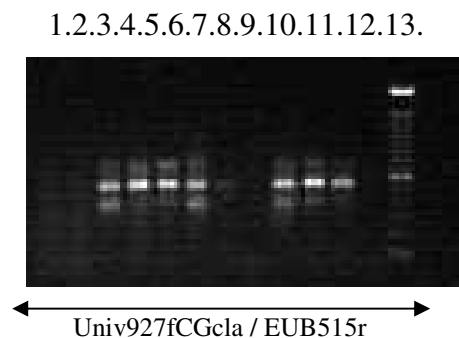


Figure VI.2 : Gel d'agarose obtenu avec les amplicons d'ADN extraits directement des prélèvements de réacteur.

Seule une amplification est observée avec le couple d'amorce Univ927fCGcla / EUB515r (figure VI.2), celle-ci sera donc utilisée en gel DGGE. En effet, le même couple d'amorce et le même ADN ont été utilisés mais aucune amplification n'a été observée. Toutes les amplifications avec des amorces GC réalisées ensuite ont donné le même résultat : de l'ADN est visualisé sur les gels mais aucune amplification. Un seul gel DGGE a été effectué du fait qu'une seule amplification avec les amorces GC clamp a fonctionné.

Marqueur 1.2. 3. 4. 5. 6.7.8. 9.10.11.12

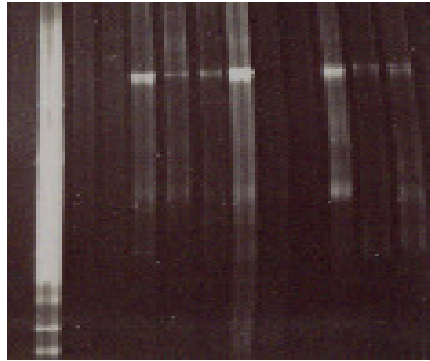


Figure VI.3 : Gel DGGE

Dans les deux premiers puits (Figure VI.3) les « amplicons » de *Fibrobacter* en culture pure ont été déposés. Comme prévu aucun signal n'est visible du fait qu'aucun signal n'était détecté après la PCR sur la figure VI.2 (les échantillons ont été déposés dans le même ordre sur les deux gels). Les puits 3 à 7 et 12 correspondent à différentes cultures en réacteur dont la source de carbone est le glucose. Seuls les puits 6 et 7 correspondent à la même culture mais à des temps différents respectivement 1000 h et 1240 h de culture. Ce qu'il faut noter ici est que le signal n'est pas le même dans les puits 6 et 7 alors qu'ils proviennent de la même culture. Soit il faut mettre en cause les biais de l'amplification par PCR et des amorces universelles, soit les contaminants ne survivent pas en réacteur plus de 1000 h. Dans les puits 7 et 12 aucun signal n'est observé. Dans les puits 3 et 6 deux bandes différentes sont observées ce qui traduit la présence d'une ou deux bactéries. Dans les puits 4 et 5, une seule bande est observée ce qui traduit la présence d'une seule bactérie. Dans le puit 8 (culture sur paille) aucun signal n'est observé. Dans le puit 9 (culture sur le substrat MAP) une bande bien distincte est observée ce qui traduit la présence d'une seule bactérie. Les résultats DGGE montrent la présence de bactéries dans le plus grand nombre d'échantillons par la présence d'un signal. Cependant il faut signaler que l'absence de signal ne signifie par forcément l'absence de bactéries mais peut signifier que les amorces utilisées ne correspondent pas aux bactéries présentes. Ces résultats ne montrent pas avec certitude la présence de contaminants. Nous avons donc décidé de séquencer les espèces présentes.

2.3 Identification des contaminants cultivables

Les prélèvements de réacteur ont été mis en culture sur les mêmes milieux que ceux utilisés pour les cultures solides mais ils sont additionnés d'agar. Les résultats des cultures sont présentés dans les tableaux VI.2.

Comme pour les cultures en milieux liquides, il est intéressant de noter qu'une croissance est observée en aérobie pour certains milieux ce qui ne devrait pas être observé si *Fibrobacter succinogenes* était la seule bactérie présente. La deuxième chose intéressante à observer est une croissance dans certains des milieux contenant comme seule source de carbone le succinate (+) que ce soit le milieu 284 ou sistrum. En effet une croissance est observée sur les milieux 284 succinate et sistrum succinate dans les échantillons des cultures sur paille et sur le substrat MAP et dans le milieu sistrum succinate dans les échantillons des cultures sur glucose avec renouvellement du milieu de culture.

	Milieux	Fs	32F glucose	33F paille	34F Labmet	35F mix
Aérobie	869	+	+	+	+	+
	284 glc	+	-	+	+	-
	284 succ	-	-	+	+	-
	Sis glc	+	+	+	+	+
	Sis succ	-	+	+	+	-
Anaérobie	869	+	+	+	+	+
	284 glc	+	-	+	+	-
	284 succ	-	-	-	+	-
	Sis glc	+	-	+	+	+
	Sis succ	-	-	+	+	-

Tableau VI.2 : Résultats des repiquages en boîtes des différents prélèvements de réacteurs, + croissance, - pas de croissance.

Sur les boîtes de pétri dont les cultures ont été effectuées à partir de *F.s.* en culture pure les colonies sont les mêmes quel que soit le milieu. En effet elles se présentent sous forme d'un léger tapis transparent. Ce tapis transparent est observé sur la majorité des milieux utilisés. Cependant d'autres colonies ont été observées telles que des petites colonies, rondes, isolées,

blanches ou des petites colonies rondes, isolées, et jaune et des colonies rouges mais ces colonies ne sont présentes qu'en très faible quantité et très rarement.

Les isolements des colonies ont été effectués sur les mêmes milieux que le milieu de culture d'origine. Pour certains isolements aucune croissance n'a été observée notamment sur le milieu sistrum succinate. Il se peut donc que pour ces isolements négatifs les colonies observées lors du premier repiquage aient utilisé la source de carbone apportée par l'inoculum et non le succinate.

Après l'isolement des colonies, des PCR ont été effectuées sur celles-ci, soit directement en prélevant une colonie sur une boîte et en l'intégrant au mix de PCR, soit après extraction de l'ADN (méthode Fastprep). Les résultats obtenus sont présentés sur les figures VI.4 A et B.

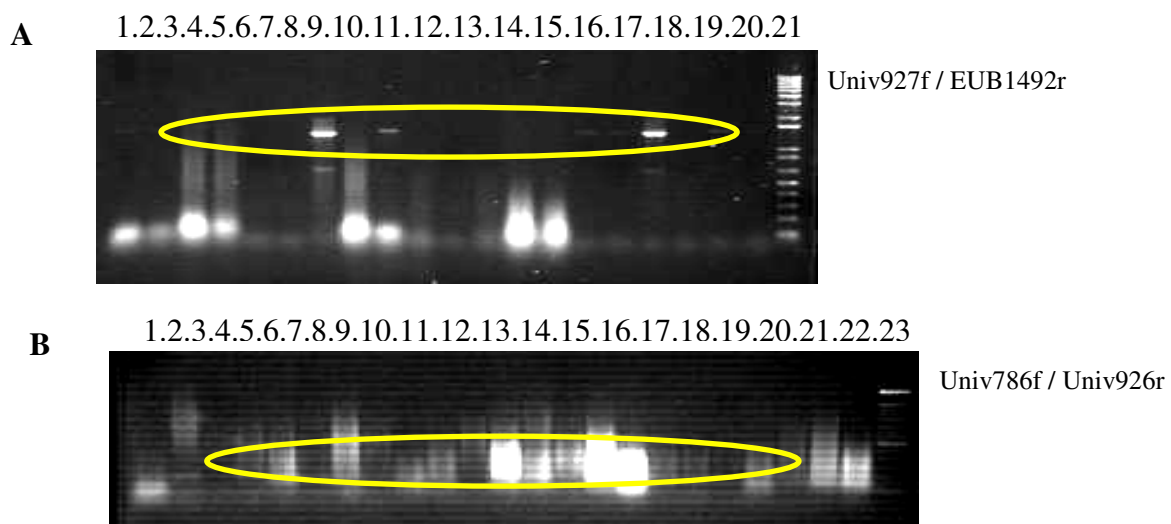


Figure VI.4 : Gel d'agarose, A : amplifications effectuées directement sur les colonies, B : amplifications effectuées sur les purifications des colonies

Des amplifications sont observées mais pour certaines la bande obtenue n'est pas assez séparée des autres pour pouvoir passer au séquençage et le bruit de fond est trop important. Il a donc été décidé de réamplifier les amplicons.

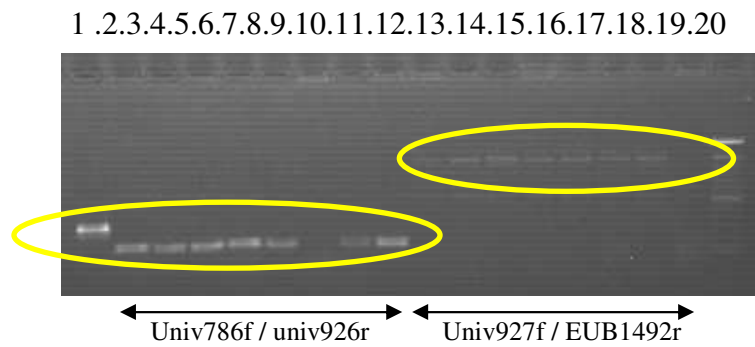


Figure VI.5 : Gel d'agarose obtenu après réamplification.

La figure VI.5 présente les résultats de la réamplification des amplicons avec les mêmes couples d'amorces. Pour les amplifications effectuées avec le couple Univ786f / univ926r les amplicons sont suffisamment distincts pour les utiliser pour le séquençage. Par contre une troisième amplification avec le couple Univ927f / EUB1492r s'avère nécessaire avant le séquençage.

Le séquençage a ensuite été effectué.

13 isolats ont été séquencés et la comparaison de séquence (avec le programme en ligne sur internet : NCBI BLAST) les regroupent en 5 groupes : *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Sphingomonas* et *Clostridium* et notamment *Clostridium butyricum*. Les différents pourcentages de similitudes sont regroupés dans le tableau VI.3 avec ces espèces et avec *Fibrobacter succinogenes* ainsi que la provenance des échantillons.

Les espèces caractérisées possèdent toutes des pourcentages de similitude importants avec les séquences isolées mais également des pourcentages de similitude importants avec des séquences de protéines de *Fibrobacter succinogenes*.

Provenance	Milieu d'isolement	Bactéries identifiées	% Similitude avec les bactéries identifiées	% Similitude avec <i>F.s. S85</i>
Culture sur glucose avec renouvellement du milieu	869 Ae	Staphylococcus	98/98	91/-
Culture sur paille	869 Ae	Bacillus	98/98	90/-
Culture sur paille	Sis glc Ae	Bacillus	96/99	91/93
Culture sur paille	869 An	Enterococcus	97/98	90/100
Culture sur paille	869 An	Bacillus	98/96	91/93
Culture sur le substrat MAP	284 suc Ae	Shingomonas	96/98	89/93
Culture sur le substrat MAP	Sis glc Ae	Shingomonas	99/98	89/93
Culture sur le substrat MAP	284 suc An	Shingomonas	97/98	89/93
Culture sur le substrat MAP	284 suc An	Shingomonas	95/98	89/93
Culture sur le mélange de végétaux	869 Ae	Enterococcus	97/98	91/93
Culture sur le mélange de végétaux	869 Ae	Enterococcus	99/97	91/100
Culture sur le mélange de végétaux	869 Ae	Clostridium	97/98	87/89
Culture sur le mélange de végétaux	869 An	Enterococcus	93/83	89/84

**Tableau VI.3 : Résultats des alignements de séquence, Amorce sens / Amorce anti sens, -
: aucun alignement**

3 DISCUSSION

Fibrobacter succinogenes fermente le glucose et le cellobiose pour produire du succinate, de l'acétate, du formiate et du CO₂ (Bryant et Burkey, 1953 ; Scheifinger et Wolin, 1973 ; Steward et Flint, 1989 ; Weimer, 1993) et les produits obtenus sont les mêmes quel que soit le substrat utilisé (Matheron *et al.*, 1996). Dans nos cultures, deux autres métabolites sont produits : le propionate et le butyrate. L'apparition du propionate peut être expliqué par une décarboxylation de certains peptides tels que l'alanine (Michal, 1999) ou le tryptophane (Gottschalk, 1986). Cependant la production de butyrate ne peut s'expliquer de cette façon. En effet, pour produire du butyrate *Fibrobacter succinogenes* devrait posséder une série d'enzymes telles qu'une 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ou une butyryl-CoA déshydrogénase présentes chez *Clostridium sp.* (Michal, 1999) qui à partir de l'acetyl-CoA permettent d'obtenir du butyrate. Or aucun auteur ne fait mention de ces enzymes chez *F.s.*. Pour ces raisons nous avons cherché à expliquer la production de butyrate par la présence d'autres bactéries.

La recherche de contaminants dans une culture de micro-organisme peut se réaliser à plusieurs niveaux. Le premier est la recherche par microscopie car en général la morphologie d'un micro-organisme est assez simple pour servir de base à l'identification. Mais cette technique s'avère peu performante lorsque le substrat utilisé est complexe tel que des végétaux. Le deuxième est une recherche par des techniques classiques de microbiologie car dans certains cas l'identification nécessite l'isolement en culture pure et la réalisation de multiples tests physiologiques et biochimiques. Ces techniques classique de microbiologie peuvent être soit complétées soit remplacées par des techniques d'identification par biologie moléculaire dont la meilleure alternative est de se baser sur les similitudes ADN-ADN.

Les premières approches dans le domaine moléculaire se sont basées sur l'ARNr 5S directement extrait des échantillons mais cette approche est réservée aux échantillons dont l'environnement est peu complexe (Amann *et al.*, 1995) car le 5S ne contient que 120 nucléotides alors que le 16S en contient 1500 et le 23S, 3000. De ce fait l'analyse est plus performante avec les deux derniers. Les étapes de l'analyse sont les suivantes : extraction, amplification (PCR), clonage, séquençage et comparaison de séquences avec les banques de

données. Le 16S est un outil puissant et essentiel pour l'étude de la diversité bactérienne d'un environnement particulier aussi bien sur le plan génétique que sur le plan de l'évolution ou de la taxonomie (Hongoh *et al.*, 2003). La PCR facilite la détection de micro-organismes non cultivables ou dont les conditions de cultures sont difficilement reproductibles en laboratoire. Ainsi l'expansion de cette méthode a permis l'identification de nombreux groupes taxonomiques (Backer *et al.*, 2003) et une avancée importante dans la connaissance de la taxonomie et de l'écologie bactérienne (Hongoh *et al.*, 2003). De plus elle a permis la création de nombreuses amorces, soit spécifiques d'espèces, soit universelles, permettant de faciliter la détection de micro-organismes dans un environnement complexe. Cependant l'identification globale des espèces présentes que nous avons effectués, ne permet pas d'infirmer ou d'affirmer la présence d'un contaminant dans nos cultures. En effet seul un petit nombre d'échantillon a pu être amplifié.

Nous avons donc décidé d'utiliser une autre technique qui consiste à amplifier l'ADN extrait avec des amorces GC afin d'effectuer des DGGE. L'électrophorèse en gel à gradient dénaturant (DGGE) est fréquemment utilisé sur des produits d'amplification d'ADN 16S pour déterminer une population bactérienne et pour permettre l'analyse de la diversité et la dynamique d'une population bactérienne dans un environnement complexe (Watanabe *et al.*, 2001). Cette technique permet de séparer les fragments d'ADN après PCR en fonction de leur séquence ce qui aboutit à la discrimination des espèces présentes. Les résultats obtenus en DGGE montrent la présence de bactéries mais l'amplification PCR a été effectuée avec des amorces GC universelles, donc susceptibles d'amplifier *F.s.*, ce qui ne nous permet pas d'infirmer ou d'affirmer la présence d'un contaminant dans nos cultures. Pour réduire ce phénomène, certains auteurs utilisent des amorces universelles contenant des nucléotides dégénérés à certaines positions pour les études moléculaires d'écologie microbienne. Alternativement des résidus inosine à des positions ambiguës peuvent être utilisés. La polymérase incorpore alors sélectivement des cytosines en complément des résidus inosine (Watanabe *et al.*, 2001) ce qui permet de majorer les bandes de DGGE, d'éviter certains biais provoquée par la PCR et donc de détecter un plus grand panel de micro-organismes.

Une troisième technique a donc été utilisée afin de déterminer l'existence d'autres bactéries dans nos cultures : séquencer les espèces présentes. Le séquençage a permis d'isoler 5 espèces de bactéries qui peuvent être responsables de la contamination : les *Enterocoques*, les *Sphingomonas*, les *Bacillus*, les *Clostridium*, et les *Staphylocoques*. Cependant afin de

pouvoir discriminer l'une ou l'autre des espèces il faut connaître leur habitat et leurs caractéristiques. Les *Enterocoques* (Famille des *Enterococcaceae*) sont des coques Gram positif se cultivant en aérobiose. Ils sont souvent en chaînettes plus ou moins longues parfois en diplocoques. Ils sont généralement parasites des muqueuses digestives et commensales de la flore intestinale et de ce fait ils sont des hôtes fréquents de l'intestin. Les *Sphingomonas* sont des bacilles Gram positif, strictement aérobies et produisent des colonies jaunes. Ils sont largement répandus dans la nature et sont fréquemment isolés des milieux aquatiques, du sol, des boues...etc. De même, ils ont été isolés à partir de procédés de traitement des déchets biologiques du support de vie artificielle. Les *Bacillus* (Famille des *Bacillaceae*) sont les bacilles Gram positif se cultivant en aérobiose stricte ou aéroanaérobiose. L'examen microscopique est très important pour l'identification, en particulier la forme et l'effet de la spore. Les *Bacillus* sont des germes ubiquitaires de l'environnement, en particulier du sol. Ils sont fréquemment isolés comme contaminants. Certains sont thermophiles : leur optimum de température de développement est situé vers 55°C (*B. stearothermophilus*). Des *bacillus* tel que *B. subtilis* ou *B. cereus* sont retrouvés en faible quantité dans le rumen (Bryant, 1959). Les *Clostridium* sont des bacilles anaérobies strictes et sporulés. *Clostridium argentinense*, *Clostridium baratii*, *Clostridium botulinum* et *Clostridium butyricum* sont largement répandus dans l'environnement (sol, eau douce, sédiments marins, végétaux en décomposition) dans lequel les spores sont capables de survivre durant de longues périodes. Compte tenu de cet habitat, ces bactéries peuvent être présentes dans le tube digestif de l'homme et des animaux (*C. butyricum*, *C. lochheadii* et *C. longisporum* ont été isolées du rumen par Bryant (1959)) et elles peuvent contaminer des denrées alimentaires. Les *Staphylocoques* sont des coques à Gram positif classiquement disposés en amas possédant une catalase, oxydase négative et toujours immobiles. Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Cependant, disséminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement.

D'après ces données parmi les cinq espèces identifiées, trois sont aérobies strictes et une ne produit pas de butyrate. Les isolats aérobies sont certainement apparus au moment des prélèvements dans le réacteur car ces isolats sont des germes fréquemment retrouvés dans l'environnement. Cependant même s'ils sont présents dans le réacteur, ils ne peuvent survivre dans les conditions d'anaérobiose et donc ne peuvent produire le butyrate. Les seuls qui peuvent survivre sont les *Bacillus* car ils forment des spores en conditions anaérobies. Cependant les spores ne produisent pas de butyrate. En conséquence, le seul contaminant qui

peut être présent semble être *Clostridium sp.*, capable de produire du butyrate (Gottschalk, 1986).

Ces résultats doivent être vérifiés parce que la contamination et/ou le contaminant ne sont pas définitivement prouvés. En effet, une amplification PCR a été effectuée avec les amorces spécifiques de *C. butyricum* pour confirmer la présence de cette bactérie mais aucune amplification n'a été observée. De plus, les séquences isolées sont également très proches de certaines séquences de protéines de *Fibrobacter succinogenes*. Une des explications pourrait être que pendant les amplifications avec les amorces universelles (avant le séquençage), certaines séquences ont été préférentiellement amplifiées par rapport à d'autres ayant pour résultat la non détection de la bactérie cible. Enfin, lors de l'amplification, certaines séquences peuvent être préférentiellement amplifiées par rapport à d'autres, cas très fréquent dans les vérifications de contamination (Amann *et al.*, 1995) et certaines associations aspécifiques peuvent se créer.

C'est pour cela que les résultats de PCR doivent être pris et interprétés avec précaution et il paraît donc préférable de faire appel à l'hybridation par sondes nucléotidiques ou à l'hybridation totale de la cellule avec des sondes ARNr spécifique. Cet outil semble le plus convenable pour déterminer la phylogénétique d'un micro-organisme dans son environnement et il serait intéressant de l'utiliser pour nos cultures.

Il reste cependant l'hypothèse, qui ne doit pas être écartée, que *F.s.* dispose effectivement de l'équipement enzymatique pour produire du butyrate (et du propionate). Ceci reste toutefois à prouver.

4 CONCLUSIONS

La recherche de contaminants bactériens a été effectuée afin d'expliquer la présence de butyrate et de propionate dans les cultures en bioréacteur. Cette étude a été menée en trois axes :

- l'identification globale des espèces présentes,
- l'analyse de la diversité microbienne,
- l'identification des contaminants cultivables.

Cinq espèces ont été identifiées mais seulement une est susceptible d'être le contaminant présent dans les cultures : *Clostridium butyricum*.

Cependant, l'hypothèse que *F.s.* dispose de l'équipement enzymatique pour produire du butyrate (et du propionate) ne doit pas être écartée.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le traitement des déchets végétaux pose des problèmes environnementaux et de santé publique. En effet, annuellement, une grande quantité de déchets végétaux, est produite dans le monde. Ce sont les résidus des activités agricoles, sylvicoles et de la transformation industrielle des produits alimentaires. En conséquence, l'utilisation des micro-organismes afin de dégrader, de réduire ou d'améliorer ces matières polluantes est un vrai défi environnemental.

Dans cette étude, un réacteur anaérobie a été conçu avec les objectifs de rassembler de nouvelles informations sur la capacité *Fibrobacter succinogenes* à se développer et dégrader plusieurs substrats végétaux : paille de blé, chou, tourteau de soja, un modèle de déchets comportant la paille de blé, le soja et le chou (1/3 de chacun) et un substrat issu d'une première dégradation par biométhanogenèse (le substrat MAP). Avant d'effectuer ces dégradations le procédé a été validé pour la culture de *Fibrobacter succinogenes*.

Nous nous sommes donc tout d'abord intéressés aux cultures en bioréacteur de *Fibrobacter succinogenes* sur glucose afin de valider le procédé avant de l'utiliser pour la dégradation de déchets végétaux. Les expériences effectuées sur du glucose en bioréacteur, montrent clairement que *Fibrobacter succinogenes* produit deux métabolites principaux : acétate et succinate).

De plus l'analyse des bilans matières montre des valeurs du taux de recouvrement de carbone et de l'azote supérieures à 90%, ce qui indique que le procédé utilisant *Fibrobacter succinogenes* est bien suivi et confirme la validité des méthodes et des techniques utilisées pour déterminer les quantités de substrats consommés et de produits formés. Ces résultats rendent donc possible l'utilisation du procédé pour des cultures de *Fibrobacter succinogenes* avec des végétaux comme substrats de la croissance.

Par ailleurs, nous avons constaté que la croissance sur glucose suivait le même profil que la production d'AGV. De la même manière la production de CO₂ suit le même profil que la production d'AGV. Ainsi la production de CO₂ et la production des AGV peuvent être corrélées avec la croissance. La production de CO₂ est donc un indicateur de croissance

simple et intéressant notamment durant les cultures sur végétaux où aucun suivi direct de la croissance n'est possible.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à la dégradation d'un mélange défini des végétaux (chou, paille de blé et tourteau de soja : 1/3 de chaque) ainsi qu'à la dégradation individuelle de chacun des végétaux constituant le mélange. Ces cultures de dégradation de végétaux ont permis de mettre en avant trois points.

Le premier point est que la dégradation du mélange de végétaux se fait en deux étapes. Une étape de dégradation rapide des substrats avec des productions importantes en métabolites et en CO₂ puis une étape lente de dégradation et de production. Ce phénomène est observé après chaque ajout de substrat. Ceci suggère la dégradation de deux types de substrats : l'un facilement dégradable comme des sucres libérés pendant la stérilisation ou la cellulose accessible : le second, un substrat composé des parties moins accessibles des végétaux (hémicellulose et cellulose liées à la lignine). Ces substrats, pour être dégradés, nécessitent la synthèse d'enzymes spécifiques qui ne dégradent pas la cellulose mais d'autres polymères des parois végétales comme des xylanases. Ensuite, les résultats de la dégradation des différents végétaux séparément, indiquent que les cinétiques de dégradation et de production sont différentes selon le substrat utilisé. La paille est dégradée de façon moins efficace que le soja qui lui est moins bien dégradé que le chou. Ces différences s'expliquent par deux phénomènes : la taille des particules et les différences de composition en cellulose, hémicellulose et lignine des substrats. En effet, la taille des particules influe sur les phénomènes d'adhésion et *Fibrobacter succinogenes* a besoin d'une adhésion très étroite (Miron *et al.*, 1989) avec les fibres pour les dégrader plus rapidement (Chesson et Forsberg, 1997). La composition en fibres (cellulose, hémicellulose et lignine) joue un rôle important dans les phénomènes enzymatiques. Ainsi le substrat contenant moins de lignine est plus facilement dégradable du fait de l'accessibilité plus importante de la cellulose et de l'hémicellulose pour les cellulases dont l'activité cellulosique globale est exprimée de façon continue, alors que les substrats comme la paille qui contiennent plus de lignine sont dégradés plus difficilement du fait que l'activité des enzymes nécessaires à rendre la cellulose et l'hémicellulose plus accessible est induite par le substrat.

Enfin, les résultats obtenus montrent une grande efficacité de *Fibrobacter succinogenes* en bioréacteur vis-à-vis de la dégradation des substrats végétaux. En effet, celui-ci permet d'obtenir des rendements de dégradation similaires à ceux obtenus en biométhanogenèse et supérieurs à ceux obtenus en compostage. Ceci fait de *Fibrobacter succinogenes* un bon candidat pour dégrader le substrat MAP

La troisième partie a été consacrée à la dégradation du substrat MAP et à son optimisation. Le substrat MAP est constitué de végétaux et de fèces. Ce substrat avant d'être dégradé par *Fibrobacter succinogenes* subit une première dégradation dans un réacteur de méthanogenèse, (Laboratoire LabMET, UGent, Belgique). Après la fermentation par *Fibrobacter succinogenes* ce substrat subit un traitement physico-chimique au laboratoire d'ingénierie des procédés thermique (TUHH, Allemagne). Ces trois procédés ont été mis en place afin de développer une technologie alternative au premier compartiment de l'écosystème MELiSSA. Le compartiment liquéfacteur actuel de la boucle MELiSSA doit assurer la solubilisation des déchets végétaux produits par l'équipage. C'est donc dans cette optique qu'a été mis en place le projet MAP et notre travail sur ce substrat.

Avec ce substrat nous avons tout d'abord procédé à une dégradation classique telle qu'elle a été effectuée sur les végétaux en mélange, c'est-à-dire en fed batch avec une quantité de 33 g de substrat par alimentation. Les résultats obtenus montrent que *Fibrobacter succinogenes* est capable de se développer sur ce substrat et est capable d'améliorer la dégradation de 27%.

Lors d'un deuxième échange de substrat entre les partenaires, nous nous sommes intéressés au mode d'alimentation de notre bioréacteur. En effet, nous avons cherché à augmenter la vitesse et l'efficacité de la dégradation du procédé de fermentation par *F.s.* Pour ces raisons, nous avons décidé d'introduire la totalité du substrat à notre disposition (200 g) afin d'observer le comportement de *Fibrobacter succinogenes* face à une quantité en substrat plus importante. Les résultats obtenus montrent une amélioration du rendement de dégradation (32%) sans perturber les quantités en métabolites et en CO₂ produites. Cependant nous observons un arrêt des productions à partir de 150 h de culture. Ceci suggère la présence d'une inhibition certainement provoquée par les métabolites eux-mêmes.

Pour ces raisons nous avons décidé lors du troisième échange de ne pas changer le mode d'alimentation mais de renouveler le milieu de culture à 150 h. Des expériences préliminaires ont été effectuées sur glucose afin de vérifier la faisabilité du renouvellement et d'observer les

éventuelles perturbations que le changement de milieu pourrait provoquer sur la croissance de *Fibrobacter succinogenes*. Les résultats prouvent que le milieu peut être renouvelé sans perturber la croissance. Ce changement a donc été effectué lors de la dégradation du substrat MAP. Le rendement de dégradation obtenu est plus élevé (36%) que celui obtenu sans changement de milieu. Les quantités produites en métabolites et en CO₂ sont similaires à celles obtenues précédemment. Ceci montre que le renouvellement du milieu de culture permet l'élimination totale ou partielle de l'inhibiteur.

La dernière partie de ce travail a été consacrée au problème de la présence de propionate et de butyrate dans nos cultures et à la recherche de contaminants bactériens. En effet, le propionate et le butyrate ne sont pas des métabolites répertoriés classiquement comme étant produits par *Fibrobacter succinogenes* bien qu'ils aient été retrouvés fréquemment dans les cultures. L'explication la plus plausible est donc la présence d'une ou plusieurs bactéries dans notre bioréacteur qui produiraient ces métabolites. Les manipulations pour la recherche de contaminants ont été effectuées au sein du laboratoire de microbiologie SCK-CEN (Centre d'étude pour l'énergie nucléaire, Mol, Belgique) avec trois directions principales.

Le premier axe a été d'identifier de façon globale les espèces présentes dans des prélèvements de réacteur par amplification d'ADN à l'aide d'amorces universelles et spécifiques d'espèces. Cependant ces amplifications n'ont pas permis d'identifier clairement un contaminant.

Le deuxième axe a consisté en une analyse de la diversité microbienne des échantillons par une technique fréquemment utilisée pour l'analyse de la diversité des populations bactériennes dans un environnement complexe (Watanabe *et al.*, 2001) : la DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis). Ici également rien ne prouve l'existence d'une contamination dans nos cultures.

Enfin, le troisième axe de recherche a été d'identifier les contaminants cultivables de nos échantillons. Pour cela des cultures ont été effectuées sur milieu solide afin d'isoler des colonies et de pouvoir amplifier leur ADN dans le but de le séquencer. Ce séquençage nous a permis d'obtenir 5 isolats dont un seul pourrait constituer un contaminant de nos cultures : *Clostridium* sp.. En effet certains *Clostridium*, notamment *Clostridium butyricum*, sont capables de produire du butyrate en anaérobiose stricte. Cependant il faut prendre ces résultats

avec précaution. En effet, plusieurs problèmes peuvent se poser et la technique de PCR peut engendrer des erreurs et des biais attribués à des facteurs très complexes tels que l'hybridation entre les amorces et l'ADN, la température d'hybridation...etc. (Hongoh *et al.*, 2003). Le premier facteur d'erreur est l'extraction qui est une étape cruciale car tous les micro-organismes ne lysent pas de la même façon. Il paraît donc plus judicieux d'après ces auteurs de faire appel à l'hybridation par sondes nucléotidiques ou à l'hybridation totale de la cellule avec des sondes ARNr spécifique. Cet outil semble le plus convenable pour déterminer la phylogénétique d'un micro-organisme dans son environnement et il serait intéressant de l'utiliser pour nos cultures.

Enfin, toutes les fermentations effectuées ont été simulées grâce au programme "Anaerobic Waste Compartment Modelling and Simulation" mis au point pour simuler les cultures de micro-organismes utilisées dans le projet MELiSSA. Le but final étant de se servir de ces simulations pour prédire des rendements de dégradation ou des quantités en métabolites produits. Ces simulations montrent une très grande similitude avec les résultats expérimentaux, ce qui permet d'affirmer qu'elles peuvent être utiles pour simuler la dégradation par *Fibrobacter succinogenes*.

Les voies d'optimisation de la dégradation de végétaux par *Fibrobacter succinogenes* sont probablement étroites et ne pourront être faites qu'avec une connaissance parfaite de la physiologie de *Fibrobacter succinogenes*. Cependant, l'optimisation de notre procédé ne pourra se faire qu'en s'intéressant aux trois points soulevés dans ce travail de thèse.

Le premier est la connaissance des activités enzymatiques dans nos conditions de cultures. Quelques essais préliminaires ont été réalisés pour déterminer la composition de l'équipement et l'activité enzymatique dans nos conditions de culture. Les résultats ont clairement montré que les enzymes qui sont mobilisées ne sont pas identiques et ont des activités différentes selon le substrat utilisé. Cependant aucune conclusion réelle n'a pu être retenue de ces essais. Pour ces raisons, les études des activités enzymatiques doivent être poursuivies dans l'optique d'améliorer la dégradation de végétaux en bioréacteur anaérobie. Ces études pourraient en effet permettre d'élucider certains points de la dégradation afin de l'améliorer. Une des clefs de cette amélioration se situe probablement dans notre connaissance des enzymes et de leurs activités selon nos conditions de culture.

De plus, nous avons observé un effet inhibiteur des métabolites sur la croissance de *Fibrobacter succinogenes*. Lever cet effet inhibiteur constitue le deuxième point d'optimisation possible. En effet, le passage du système discontinu à un système en continu où l'intégration d'une membrane au sein du réacteur pourraient permettre d'éliminer cet inhibiteur. L'évolution vers un système en continu est en cours au LGCB (Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique) constitue un autre travail de thèse. Les résultats obtenus sur glucose sont très encourageants. En effet, la mise en continu des cultures permet d'éliminer totalement l'effet inhibiteur des métabolites.

Le troisième point d'optimisation porte sur la probable présence d'un contaminant. En effet, ce contaminant doit soit être éliminé, soit être identifié avec précision. Car si nous nous situons d'un point de vue purement fondamental, le travail en culture pure est une condition indispensable à l'étude de la physiologie de *Fibrobacter succinogenes*. Cependant, si le but est uniquement d'optimiser la dégradation de végétaux, ce contaminant doit être identifié afin de pouvoir s'intéresser à la physiologie de la co-culture. C'est ce qui est fait dans un grand nombre de procédés de dégradation de déchets végétaux.

ABRÉVIATIONS

ABR : Anaerobic baffled reactor,
 ADN : Acide déoxyribonucléotidique,
 APS : Ammonium persulfate,
 AGV : Acides gras volatils,
 ATP : Adénosine triphosphate
 CI : Premier compartiment
 CBD : Domaine d'adhésion à la cellulose,
 CBH : Cellobiohydrolase,
 CBP : Consolidated bioprocessing,
 CBPs : Cellulose binding proteins,
 CD : Domaine catalytique,
 CES : Closed ecological system,
 CELSS : Controlled ecological life support system,
 CMC : Carboxyméthyl-cellulose
 CMCase : Carboxyméthyl-cellulase
 CNRS : Centre national de recherche scientifique,
 CSTR : Continuously stirred tank reactor,
 DGGE : Denaturing gradient gel electrophoresis,
 DHAP : Dihydroxyacétone-phosphate,
 DMC : Direct microbial conversion,
 EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique,
 EGSB : Expanded granular stage sludge reactor,
 EMP : Embden Meyerhof Parnas
 ESA : European space agency,
 F1,6PP : D-fructose-1,6-diphosphate,
 FISH : Fluorescence in-situ hybridation,
 G3P : Glyceraldehyde-3-phosphate,
 G6P : Glucose-6-phosphate,
 GH : Glycosyl-hydrolase,
 GTP : Guanosine triphosphate
 HPLC : Chromatographie liquide haute performance,
 HRGP : Hydroxyprolin rich glyco protein,
 LSS : Life Support System,
 MAP : Microgravity application programme,
 MELiSSA : Micro ecological life support system alternative,

MS : Matière sèche,
 NAD : Nicotiamine adénine dinucléotide,
 NADH : Nicotiamine adénine dinucléotide phosphate,
 PABR : Periodic Anaerobic baffled reactor,
 PCR : Réaction de polymérisation en chaîne,
 PEP : Phosphoénol-pyruvate,
 PEP-PTS : Phosphoénol-pyruvate phosphotransférase,
 RT-PCR : Transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne,
 RUSITEC : Rumen simulated technique,
 SDS : Sodium dodécyl sulfate
 SHF : Separate hydrolysis and fermentation,
 SSCF : Simultaneous saccharification and co-fermentation,
 SSF : Simultaneous saccharification and fermentation,
 TBE : Tris borate EDTA,
 TE : Trisbase EDTA,
 TEMED : N,N,N',N'-trétra méthyl éthylène diamine,
 USAB : Up-flow anaerobic sludge blanket,
 USSB: Up-low stage sludge reactor,

REFERENCES

- Akin D.E. (1979). Microscopic evaluation of forage digestion by rumen microorganisms. *J Anim. Sci.* 48, 701-710.
- Akin D.E. (1988). Biological structure of lignocellulose and its degradation in the rumen. *Anim. Fd Sc. Technol.* 21, 295-310.
- Akin D.E. (1989). Histological and physical factors affecting digestibility of forage. *Agron. J.* 81, 17-25.
- Albrecht T., Brunner G. (2004). Testing of additional liquefaction technologies with raw (model) substrate Technical note 4.5, 1-15.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cell without cultivation. *Microbiol. R.* 59, 143-169.
- Amner W., McCarthy A.J., Edward C.A. (1988). Quantitative assessment of factors affecting the recovery of indigenous and released thermophilic bacteria from compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3107-3112.
- Angelidaki I., Mogensen A.S., Ahring B.K. (2000). Degradation of organic contaminants found in organic wastes. *Biodegradation* 11, 377-83.
- Angelidaki I., Ellegaard L., Ahring B.K. (2003). Applications of anaerobic digestion process. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 81, 2-33.
- Aro N., Pakula T., Penttilä M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *Microbiol. Rew.* 29, 719-739.
- Augenstein D., Wise D.L., Dat N.X., Khien N.D. (1996). Composting municipal solid waste and sewage sludge: potential for fuel gas production in developing country, *Res. Conserv. Recly.* 16, 265-279.
- Bach Knudsen K.E. (1997). Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim. Fd Sci. Technol.* 67, 319-338.
- Backer G.C., Smith J.J., Cowan D.A. (2003). Review and re-analysis of domain specific 16S primer. *J. Microbiol. Methods* 55, 541-555.
- Barnes S.P., Keller J. (2003). Cellulosic waste degradation by rumen-enhanced anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 48, 155-162.
- Beffa T., Blanc M., Lyon P.F., Vogt G., Marchiani M., Fischer J.L., Aragno M. (1996). Isolation of *Thermus strians* from hot composts (60 to 80°C). *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1723-1727.
- Béguin P., Aubert J.P. (1994). The biological degradation of cellulose. *Microbiol. Rev.* 13, 25-58.

- Béra-Maillet C., Gaudet G., Forano E. (2000a). Characterisation of endoglucanases EGB and EGC from *Fibrobacter succinogenes*. Biochim. Biophys. Acta. 1476, 191-202.
- Béra-Maillet C., Gaudet G., Forano E. (2000b). Endoglucanase activity and relative expression of glycoside hydrolase genes of *Fibrobacter succinogenes* S85 grown on different substrates. Biochim Biophys Acta. 1543, 77-85.
- Boss W., Shuman H. (1998). Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism and regulation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 204-229.
- Bouallagui H., Ben Cheikh R., Marouani L., Hamdi M. (2001). Fermentation méthanique des déchets solides en batch. Premières journées scientifiques de l'association Tunisienne de biotechnologie.
- Bouallagui H., Ben Cheikh R., Marouani L., Hamdi M. (2003). Mesophilic biogas production from fruit and vegetable waste in tubular digester. Biores. Technol. 86, 85-89.
- Bouallagui H., Torrijos M., Gordon J.J., Moletta R., Ben Cheikh R., Touhami Y., Delgens J.P., Hamdi M. (2004). Two-phases anaerobic digestion of fruit and vegetables wastes: bioreactors performance. Biochem. Eng. J. 21, 193-197.
- Bouallagui H., Touhami Y., Ben Cheikh R., Hamdi M. (2005). Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. Proc. Biochem. 40: 989-995.
- Bryant M.P. (1959). Bacterial species of the rumen. Bacteriol. Rev. 23, 125-153.
- Bryant M.P., Burkey L.A. (1953). Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in bovine rumen. J. Dairy Sci. 36, 205-217.
- Bryant M.P., Doestch R.N. (1954). A study of actively cellulolytic rod shaped bacteria of the bovine rumen. J. Dairy Sci. 37, 1176-1183.
- Bryant M.P., Robinson I.M., Chu H. (1959). Observation on nutrition of *Bacteroides succinogenes*, a ruminal cellulolytic bacterium. J. Dairy Sci. 42, 1831-1847.
- Bryant M.P., Robinson I.M. (1960). Studies on the nitrogen requirements of some ruminal cellulolytic bacteria. J. Dairy Sci. 9, 96-103.
- Buchanan C.J., Mitchell W.J. (1992). Two β -glucosidase activities in *Fibrobacter succinogenes* S85. J. Appl. Bacteriol. 73, 243-250.
- Buchanan M., Gilessman S.R. (1991). How compost fertilization affects soil nitrogen and crop yield. Biocycle 32, 72-76.
- Caldwell D.R., Arcand C. (1974). Inorganic and metal-organic growth requirements of the genus *Bacteroides*. J. Bacteriol. 73, 243-250.
- Callaghan F.J., Wase D.A.J., Thayanithy K., Forster C.F. (1999). Co-digestion of waste organic solids: Batch studies. Biores. Technol. 67, 117-122.

- Camp H.J.M., Verhagen F.J.M., Kivaissi A.K., Windt F.E., Lubberding H.J., Gijzen H.J. (1988). Effect of lignin on the anaerobic degradation of (lingo) cellulosic wastes by rumen microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29, 408-412.
- Campbell C.D., Darbyshire J.F., Anderson J.G. (1990). The composting of tree bark in small scale reactors-adiabatic and fixed temperature experiments. *Biological Wastes.* 31, 175-185.
- Campbell A., Engebretson R., Tripepi R. (1991). Pulp and paper sludge composting. *Tappi J.* 74, 183-191.
- Cekmecelioglu D., Demirci A., Graves R.E., Davitt N.H. (2005). Applicability of Optimised In-vessel Food Waste Composting for Windrow Systems. *Biosystems Eng.* 91, 479-486.
- Chen C.M., Gritzali M., Stafford D.W. (1987). Nucleotide sequence and deduced primary structure of the cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Biotechnol.* 5, 274-278.
- Chesson A., Steward C.S., Wallace R.J. (1982). Influence of plant phenolics acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 597-603.
- Chesson A., Forsberg C.W. (1997). Polysaccharide degradation by the rumen microorganisms, Hobson, PN, Stewart CS, the rumen microbial ecosystem, 2nd ed. Blackie Academic London, 329-381.
- Chow J.M., Russel J.B. (1992). Effect of pH and monensin on glucose transport by *Fibrobacter succinogenes*, a cellulolytic ruminal bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1115-1120.
- Cogne G., Lasseur C., Cornet J.F., Dussap C.G., Gros J.B. (2001). Growth monitoring of a photosynthetic micro-organism (*Spirulina platensis*) by pressure measurement. *Biotechnol. Letters.* 23, 1309-1314.
- Converti A., Zilli M., Arni S., Di Felice R., Del Borghi M. (1999). Estimation of viscosity of highly viscous fermentation media containing one or more. *Biochem. Eng. J.* 4, 81-85.
- Czerkawski J.W. (1976). Chemical composition of microbial matter in the rumen. *J. Sci. Fd. Agric.* 27, 621-632
- Czerkawski J.W., Breckenridge G. (1969). The fermentation of sugar-beet pulp and sucrose in artificial rumen and effect of linseed oil fatty acids on the fermentation. *Br. J. Nutr.* 23, 51-66.
- Czerkawski J.W., Breckenridge G. (1977). Design and development of a long term rumen simulation technique (RUSITEC). *Br. J. Nutr.* 38, 371.
- Damien A. (2003) Guide du traitement des déchets. In Dunod (eds). Paris.
- DeBertoldi M., Vallini G., Pera A. (1983). The biology of composting: A review. *Waste Management Research.* 1, 157-176.
- Dehority B.A. (1973). Hemicellulose degradation by rumen bacteria. *Fed Proc.* 32, 1819-1824.

- Dehority B.A., Scott H.W., Kowaluk P. (1967). Volatile fatty acid requirement of cellulolytic rumen bacteria. *J. Bacteriol.* 94, 537-543.
- Dehority B.A., Tirabasso P.A. (2000). Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2921-2927.
- Dekker R.H.F. (1976). Hemicelluloses: their occurrences, purification, preparation, and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 32, 278-319.
- Dekker R.H.F. (1983). Bioconversion of hemicellulose: aspects of hemicellulose production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymatic saccharification of hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 1127-1146.
- Dekker R.H.F. (1985). Biodegradation of the hemicelluloses. In T. Higuchi (eds.), *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Academic Press, Inc., Orlando, p 505-531.
- Dekker K., Peist R., Reild J., Krossmann M., Brand B., Boss W. (1993). Maltose and maltotriose can be formed endogenously in *Escherichia coli* from glucose and glucose-1-phosphate independently of enzymes of maltose system. *J. Bacteriol.* 175, 5655-5665.
- Denman S., Xue G.P., Patel B. (1996). Characterization of a *Neocallimastix patriciarum* cellulase cDNA (*celA*) homologous to *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1889-1896.
- Devillard E., Bera-Maillet C., Flint H.J., Scott K.P., Newbold C.J., Wallace R.J., Jouany J.P., Forano E. (2003). Characterization of XYN10B, a modular xylanase from the ruminal protozoan *Polyplastron multivesiculatum*, with a family 22 carbohydrate-binding module that binds to cellulose. *Biochem. J.* 373, 495-503.
- Diaz M.J., Madejon E., Lopez F., Lopez R., Cabrera F. (2002). Optimization of the rate vinasse/grappe marc for co-composting process. *Proc. Biochem.* 37, 1143-1150.
- Dijkstra J., Tamminga S. (1995). Simulation of the effects of diet on the contribution of rumen protozoa to degradation of fibre in the rumen. *Br. J. Nutr.* 74, 617-634.
- Dinsdale R.M., Premier G.C., Hawkes F.R., Hawkes D.L. (2000). Two-stage anaerobic co-digestion of waste activated sludge and fruit/vegetable waste using inclined tubular digesters. *Bioresour. Technol.* 72, 159-168.
- Doerner K.C., White B.A. (1990). Assessment of the endo-1,4-beta-glucanase components of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1844-1850.
- Doulami F., Demey D. (2002). The liquefying compartment in MELiSSA final report activity, p 11-18.
- Felix C.R., Ljungdahl L.G. (1993). The cellulosome: the exocellular organelle of *Clostridium*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 791-799.

- Fiala-Médioni A., Alayse A.M., Cahet G. (1986). Evidence of in situ uptake and incorporation of bicarbonate and amino acids by a hydrothermal vent mussel. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 96, 191-198.
- Field M.W., Mallik S., Russel J.B. (2000). *Fibrobacter succinogenes* S85 ferments ball-milled cellulose as fast as cellobiose until cellulose surface area is limiting. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 570-574.
- Field M.W., Russel J.B., Wilson D.B. (1997). A mutant of *Prevotella ruminicola* B14 deficient in β -1,4-endoglucanase and mannase activities. *Microbiol. letters.* 154, 9-15.
- Finstein M.S., Miller F.C., Strom P.F. (1986). Waste treatment composting. *Biotechnol* 8, 363-398.
- Finstein M.S., Morris M.L. (1975). Microbiology of municipal solid waste composting. *Adv. Appl. Microbiol.* 19, 113-151.
- Flint H.J., Zhang J.X., Martin J. (1994). Multiplicity and expression of xylanases in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Curr. Microbiol.* 29, 139-143.
- Fondevila M., Dehority B.A. (1994). Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly in coculture or added sequentially. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 541-548.
- Fonty G., Forano E. (1999). Ecologie de la dégradation et de la fermentation des polysides constitutifs des parois végétales dans le rumen. *Cahiers de l'agriculture.* 8, 21-35.
- Foreman P.K., Brown D., Dankmeyer L., Dean R., Diener S., Dunn-Coleman N.S., Goedegebuur F., Houfek T.D., England G.J., Kelley A.S., Meerman H.J., Mitchell T., Mitchinson C., Olivares H.A., Teunissen P.J., Yao J., Ward M. (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* 278, 31988–31997.
- Forsberg C.W., Gong J., Malburg Jr. L.M., Zhu H., Iyo A., Cheng K.J., Krell P.J., Philipps J.P. (1994). Cellulases and hemicellulases of *Fibrobacter succinogenes* and their roles in fibre digestion, In: K. Shimada *et al.* (ed.) Genetics, biochemistry and ecology of lignocellulose degradation. Unpublishers Co. Proceedings of the MIE Bioforum, Japan, p 125-136.
- Forsberg C.W., Lovelock L.K.A., Krumholz L., Buchanan-Smith J.G. (1984). Protease activities of rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 101-110.
- Franklund C.V., Glass T.L. (1987). Glucose uptake by cellulolytic ruminal anaerobe *Bacteroides succinogenes*. *J. Bacteriol.* 169, 500-506.
- Freelove A.C., Bolam D.N., White P., Hazlewood G.P., Gilbert H.J. (2001). A novel carbohydrate-binding protein is a component of the plant cell wall-degrading complex of *Piromyces equi*. *J. Biol. Chem.* 276, 43010–43017.
- Garcia C., Hernandez T., Costa F. (1992). Composted vs. uncomposted organics. *Biocycle.* 33, 70–72.

- Gardner RG, Wells JE, Russel JB, Wilson DB (1995). The effect of carbohydrate on the expression of *Prevotella ruminicola* 1,4-beta-D-endoglucanase. Microbiol. Letters. 125, 305-310.
- Gaskell J., Stewart P., Kersten P.J., Covert S.F., Reiser J., Cullen D. (1994). Establishment of genetic linkage by allele-specific polymerase chain reaction: application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. 12, 1372-1375.
- Gaudet G., Cheng K.J. (1990). Utilisation du glucose et du cellobiose par trois souches de *Fibrobacter succinogenes*. Reprod. Nutr. Dev. Suppl 2, 201s-202s.
- Gaudet G., Forano E., Dauphin G., Delort A.M. (1992). Futile cycle of glycogen in *Fibrobacter succinogenes* as shown by in situ ¹H NMR and ¹³C NMR investigation. Eur. J. Biochem. 207, 155-162.
- Gaudet G., Gaillard B. (1987). Vesicle formation and cellulose degradation in *Bacteroides succinogenes* cultures : ultrastructural aspects. Arch. Microbiol. 148, 150-154.
- Gavala H.N., Angelidaki I., Ahring B.K. (2003). Kinetics and modelling of anaerobic digestion process. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 81, 58-93.
- Georgacakis D., Tsavdaris A., Bakouli J., Symeonidis S. (1996). Composting solid swine manure and lignite mixtures with selected plant residues. Biores. Technol. 56, 195-200.
- Gijzen H.J., Zwart K.B., Vogels G.D. (1986). Continuous cultivation of rumen microorganisms, a system with possible application to the anaerobic degradation of lignocellulosic waste materials. Appl. Microbial. Biotechnol. 25, 155-162.
- Gijzen H.J., Derikx P.J.L., Vogels G.D. (1990). Application of rumen microorganisms for a high rate anaerobic digestion of papermill sludge. Biol. Wastes 32, 169-179.
- Gilbert H.J., Hazlewood G.P., Laurie J.I., Orpin C.G., Xue G.P. (1992). Homologous catalytic domains in a rumen fungal xylanase: evidence for gene duplication and prokaryotic origin. Mol. Microbiol. 6, 2065-2072.
- Gielkens M.M., Dekkers E., Visser J., De Graaff L.H. (1999). Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require d-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4340-4345.
- Gold M.H., Alic M. (1993). Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiol. Rev. 57, 605-622.
- Gong J., Forsberg C.W. (1993). Separation of outer and cytoplasmic membranes of *Fibrobacter succinogenes* and membrane a glycogen granule localisations of glycanases and cellobiose. J. Bacteriol. 175, 6810-6821.
- Gong J., Lo R.Y.C., Forsberg C.W. (1989). Molecular cloning expression in *Escherichia coli* of a cellodextrinase gene from *Bacteroides succinogenes* S85, App. Environ. Microbiol. 55, 132-136.

- Gottschalk G. (1986). Bacterial metabolism, in: Gottschalk G. (Eds) by Springer-verla, New York, p 228-277.
- Gray F.V., Weller A.F. Pilgrim A.F., Jones G.E. (1962). A stringent test for the artificial rumen. J. Agric. Res. 13, 143.
- Greenwood *et al.*, (1978). <http://helios.bto.ed.ac.uk>
- Groleau D., Forsberg C.W. (1981). Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. Can. J. Microbiol. 27, 517-530.
- Guy C. (1988). Etude et modelisation des produits du métabolisme microbien et de la dégradation des composés pariétaux en fermenteur semi-continu par les micro-organismes du rumen. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse.
- Haigler C.H., (1985). Cellulose chemistry and its applications, in: T.P. Nevell, S.H. Zeronian (Eds), Ellis Horwood Limited, Chichester, p 30-83.
- Halliwell G., Bryant M.P. (1963). The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from the rumen of cattle. J. Gen. Microbiol. 32, 441-448.
- Hebraud M., Fevre M. (1990). Purification and characterisation of an aspecific glycoside hydrolase from the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3164–3169.
- Hendrickx L., Janssen P., Baatout S., Marty F., Mergeay M. (2003). *Proceedings of ICES*, SAE international.
- Henrissat B., Bairoch A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 293, 781–788.
- Hermans V., Demey D. (2000). The liquefying compartment in MELiSSA final report activity, p 9-11.
- Hermans V., Demey D. (2001). The liquefying compartment in MELiSSA final report activity, p 11-17.
- Hiltner P., Dehority B.A. (1983). Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure culture of rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 46, 642-648.
- Hongoh Y., Yuzawa H., Ohkuma M., Kudo T. (2003). Evaluation of primers and PCR conditions for analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. FEMS microbiology letters 221, 299-304.
- Hoover W.H., Crooker B.A., Sniffen C.J. (1976). Effects of differential solid liquid removal rates on protozoa number in continuous cultures of rumen contents. J. Anim. Sci. 43, 529-535
- Howard G.T., White B.A. (1988). Molecular cloning and expression of cellulase genes from *Ruminococcus albus* in *Escherichia coli* bacteriophage lambda. Appl. Environ. Microbiol. 54, 1752–1755.

- Hu Z.H., Wang G., Yu H.Q. (2004). Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochem. Eng. J.* 21, 59-62.
- Hu Z.H., Yu H.Q. (2005). Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic fermentation of corn stover. *Process Biochem.* 40, 2371-2377.
- Huber H., Stetter K.O. (1998). Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. *J. Biotechnol.* 64, 39-52.
- Huang L., Forsberg C.W. (1990). Cellulose digestion and cellulase regulation and distribution in *Fibrobacter succinogenes* S85, *App. Environ. Microbiol.*, 56, 1221-1228.
- Huang L., Forsberg C.W. (1987). Isolation of a cellodextrinase from *Bacteriodes succinogenes*, *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1034-1041.
- Hungate R.E. (1984). Microbes of nutritional importance in the alimentary tract. *Proc. Nutr. Soc.* 43, 1-11.
- Joblin K.N., Williams A.G. (1991). Effect of cocultivation of ruminal chytrid fungi with *Methanobrevibacter smithii* on lucerne stem degradation and extracellular fungal enzyme activities. *Lett. Appl. Microbiol.* 12, 121-124.
- Iyo A.H., Forsberg C.W. (1999). A cold-active glucanase from the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 995-8.
- Johnson D.G., Silva M.C., Mackenzie C.R., Shneider H., Fontana J.D. (1989). Microbial degradation of hemicellulosic materials. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 20/21, 245-258.
- Joyner Jr. A.E., Baldwin R.L. (1966). Enzymatic studies of pure cultures of rumen microorganisms. *J. Bacteriol.* 92, 1321-1330.
- Kimura Y., Asada Y., Oka T., Kuwahara M. (1991). Molecular analysis of a *Bjerkandera adusta* lignin peroxidase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 510-514.
- Kivaisi A.K., Eliapenda S. (1995). Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic degradation of bagasse and maize bran. *Biomass Bioenergy.* 8, 45-50.
- Knol W, Van Der Most M.M., De Wart J. (1978). Biogas production by anaerobic digestion of fruit and vegetable waste. A preliminary study. *J. Sci. Fd Agric.* 29, 822-830.
- Komilis D.P., Ham R.K. (2006). Carbon dioxide and ammonia emissions during composting of mixed paper, yard waste and food waste: *Waste Management.* 26, 62-70.
- Kube J. (2004). Testing of a coupled thermophilic-methanogenic reactor. Technical Note 3.6, p 1-19.
- Kuhad R.C., Singh A., Eriksoon K.E.L. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 57, 47-124.

- Kulcu R., Yaldiz O. (2004). Determination of aeration rate and kinetics of composting some agricultural wastes. *Biores. Technol.* 93, 49-57.
- Kutzner H.J. (2000). Microbiology of composting. *Biotechnol.* 11, 36-99.
- Krahe M., Antranikian G., Märkl H. (1996). Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. R.* 18, 271-285
- Lasseur C., Paillé C. (2000). Introduction in MELiSSA Final report activity, p 6-8.
- Lau A.K., Lo K.V., Liao P.H., Yu J.C. (1992). Aeration experiments for swine waste composting. *Biores. Technol.* 41, 145-152.
- Leschine S.B. (1995). Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 399-426.
- Lissens G., Verstraete W. (2001). Complementary technologies for the first compartment in MELiSSA Final report activity, p 18-60.
- Lissens G., Vandevivere P., De Baere L., Biey E.M., Verstraete W. (2004). Solid waste digestors: process performance and practice for municipal solid waste digestion. *Water Sci. Technol.* 44, 91-102.
- Lissens G., Windey K. (2004). Evaluation of thermal treatment procedures for sterilisation. Technical Note 1.5, p 1-16.
- Ljungdahl L.G., Eriksson K.E. (1984). *Adv. Microbiol. Ecol.* 8, 237.
- Logson G. (1994). Worldwide progress in vermicomposting. *Biocycle.* 35, 63-65.
- Lopez-Zavala M.A., Funamizu N., Takakuwa T. (2005). Biological activity in the composting reactor of bio-toilet system. *Bioresour. Technol.* 96, 805-812.
- Lowe S.E., Theodorou M.K., Trinci A.P. (1987). Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1216-1223.
- Lynd L.R. (1996). Overview and evaluation of fuel ethanol production from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annu. Rev. Ener. Environ.* 21, 403-465.
- Lynd L.R., Weimer P.J., Van Zyl W.H., Pretorius I.S., (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 66,; 506-577.
- Maas LK, Glass TL (1991). Cellobiose uptake by the cellulolytic ruminal anaerobe *Fibrobacter (Bacteroides) succinogenes*. *Can. J. Microbiol.* 37, 141-147.
- Mac Elroy R.D. (1990). Artificial ecological systems: activities in U.S. and Japan. Advanced Life Support Division NASA, Workshop on artificial ecological systems, CNES/DARA, Marseille, France.

- Maglione G., Russel J.B., Wilson D.B. (1997). Kinetics of cellulose digestion by *Fibrobacter succinogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 63, 665-669.
- Maloy C.R., Thompson J.R., Jeffrey M.H., Sherry A.D. (1990). Contribution of exogenous substrates to acetyl coenzyme A: measurement by ^{13}C NMR under non-steady-state conditions. Biochemistry 29, 6756-6761.
- Malburg L.M., Forsberg C.W. (1993). *Fibrobacter succinogenes* possesses at least nine glucanase genes. Can. J. Microbiol. 39, 882-891.
- Malburg L.M., Tamblyn L.J.M., Forsberg C.W. (1992). Degradation of cellulose and hemicellulose by rumen microorganisms. In Microbial degradation of natural products. Edited by G. Winkelmann VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, p 127-159.
- Malburg L.M., Smith D.C., Schellhorn H.E., Forsberg C.W. (1994). *Fibrobacter succinogenes* S85 has a multiple xylanases genes. J. Appl. Bacteriol. 75, 564-573.
- Malburg L.M., Iyo A.H., Forsberg C.W. (1996). A novel family 9 endoglucanase gene (celD), whose product cleaves substrates mainly to glucose, and its adjacent upstream homolog (celE) from *Fibrobacter succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol. 62, 898-906.
- Martin S.A. (1994). Nutrient transport by ruminal bacteria: A review. J. Anim. Sci. 72, 3019-3031.
- Martin S.A., Russel J.B. (1986). Phosphoenol pyruvate-dependent phosphorylation of hexoses by ruminal bacteria: Evidence for the phosphotransferase transport system. Appl. Environ. Microbiol. 52, 1348-1352.
- Mata-Alvarez J., Cecchi F., Llabrés P., Pavan P. (1992). Anaerobic digestion of the barcelona central food market organic wastes: experimental study. Biores. Technol. 39, 39-48.
- Matheron C., (1997). Etude du métabolisme carboné et azoté de *Fibrobacter succinogenes*, bactérie cellulolytique du rumen, par RMN ^1H , ^{13}C , ^{31}P et ^{23}Na . Thèse de l'université Blaise Pascal – Clermont Ferrand.
- Matheron C., Delort A.M., Gaudet G., Forano E. (1996). Simultaneous but differential metabolism of glucose and cellobiose in *Fibrobacter succinogenes* cells, studied by in vivo ^{13}C NMR. J. Microbiol. 42, 1091-1099.
- Matheron C., Delort A.M., Gaudet G., Forano E. (1997). Re-investigation of glucose metabolism in *Fibrobacter succinogenes*, using NMR spectroscopy and enzymatic assays. Evidence for pentose phosphate phosphoketolase and pyruvate formate lyase activities. Bioch. Biophys. Acta 1355, 50-60.
- Matheron C., Delort A.M., Gaudet G., Forano E., Liptaj T. (1998). ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance study of glycogen futile cycle in strains of the genus *Fibrobacter*. Appl. Environ. Microbiol. 64, 74-81.

- Matte A., Forsberg C.W. (1992). Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85. *App. Environ. Microbiol.* 58, 157-168.
- Matulova M., Delort A.M., Nouaille R., Gaudet G., Forano E. (2001). Concurrent maltodextrin and cellodextrin synthesis by *Fibrobacter succinogenes* S85 as identified by 2D NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 268, 3907-3915.
- McAllister T.A., Bae H.D., Jones G.A., Cheng K.J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* 72, 3004-3018.
- McAllister T.A., Cheng K.J. (1996). Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62, 29-36.
- McDermid K.P., Forsberg C.W., McKenzie C.R. (1990). Purification and properties of an acetyxylan esterase from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3805-3810.
- McGavin M., Forsberg C.W. (1988). Isolation and characterization of endoglucanases 1 and 2 of *Fibrobacter succinogenes*, *Journal of Bacteriol.* 170, 2914-2922.
- McGavin M., Forsberg C.W., (1989). Catalytic and substrate-binding domains of endoglucanase 2 from *Bacteroides succinogenes*. *J. Bacteriol.* 170, 3310-3315.
- McGavin M., Lam J., Forsberg C.W. (1990). Regulation and distribution of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85 endoglucanases. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1235-1244.
- McSweeney C.S., Dulieu A., Katayama Y., Lowry J.B. (1994). Solubilisation of lignin by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2985–2989.
- Meinhardt S.W., Glass T.L. (1994a). NADH linked fumarate reductase and NADH dehydrogenase activities in *Fibrobacter succinogenes*. *Curr. Microbiol.* 28, 247-251.
- Meinhardt S.W., Glass T.L. (1994b). Characterization of the NADH dehydrogenase and fumarate reductase of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *Succinogenes* S85. *Arch. Microbiol.* 162, 329-334.
- Mergeay M., Verstraete W., Dubertret G., Lefort-Tran M., Chipaux C., Binot R. (1988). MELISSA – a microorganisms based model for CELSS development. *Proceedings of the 3rd symposium on space thermal control & life support system*. Noordwijk, the Netherlands, 3-6 October, 65-68.
- Michal G. (1999). Biochemical pathways, in: Michal G. (eds), by Wiley and sons, Inc. New York, p 182-185.
- Michel N., Doulami F. (2004). MELiSSA engineering of the waste compartment. Technical Note 71.3, p 1-42.

- Michel N., DeWever H., Dotremont C., Van Hoof V. (2005). MELiSSA engineering of the waste compartment. Technical Note 71.9.4, p 1-50.
- Miller T.L. (1978). The pathway of formation of acetate and succinate from pyruvate by *Bacteroides succinogenes*. Arch. Microbiol. 117, 145-152.
- Minato H., Suto T. (1978). Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. II. Attachment of rumen bacteria isolated from bovine rumen to cellulose powder in vitro and elution of bacteria attached therefrom. J. Gen. Appl. Microbiol. 24: 1-16.
- Miron J., Ben-Ghedalia D., Morrison M. (2001). Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. J. Dairy Sci. 84, 1294–1309.
- Miron J., Yokoyama M.T., Lamed R. (1989). Bacterial cell surface structures involved in Lucerne cell wall degradation by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 218-222.
- Miyagi T., Javorsky P., Pristas P., Karita S., Sakka K., Ohmiya K. (1998). Partial purification and characterization of RalF40I, a class II restriction endonuclease from *Ruminococcus albus* F-40, which recognizes and cleaves 5'-/GATC-3'. Microbiol. Lett. 164, 215–218.
- Mohee R., Mudhoo A. (2005). Analysis of the physical properties of an in-vessel composting matrix. Biores. Technol. 96, 1093-1101.
- Montgomery L., Flesher B., Stahl D. (1988). Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter succinogenes* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. .Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 430-435.
- Muhlemann H.M., Bungay H.R. (1999). Research perspectives for bioconversion of scrap paper. Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. 65, 193-206.
- Nyns E.J. (1986). Biomethanation processes. Biotechnol. 8, 207-267.
- Ohmiya K., Shimizu M., Taya M., Shimizu S. (1982). Purification and properties of cellobiosidase from *Ruminococcus albus*. J. Bacteriol. 150, 407–409.
- Ohmiya K., Shirai M., Kurachi Y., Shimizu S. (1985). Isolation and properties of beta-glucosidase from *Ruminococcus albus*. J. Bacteriol. 161, 432–434.
- Ohmiya K., Takano M., Shimizu S. (1990). DNA sequence of a beta-glucosidase from *Ruminococcus albus*. Nucleic Acids Res. 18, 671–678.
- Orpin C.G., Joblin K.N. (1994) in the rumen microbial ecosystem P.N. Hobson, C.S. Steward eds (Blackie, London).
- Pan J., Suzuki T., Kaike S., Veda K., Koboyashi Y., Okybo M. (2003). Effect of urea infused into the rumen on liquid on particule associated fibrolytic enzymes activities in streers fed low quality grass hal. An. Feed Sci. Technol. 104, 13-27.

- Paradis F.W., Zhu H., Krell P.J., Phillips J.P., Forsberg C.W. (1993). The *xynC* gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 codes for a xylanases with two similar catalytic domains. J. Bacteriol. 175, 7666-7672.
- Patton C.J., Crouch S.R. (1977). Spectrometric and kinetic investigation of the berthelot reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. 49, 464-469.
- Pearson R.M., Smith J.A.B. (1943). The utilisation of urea in the bovin rumen. I-Methods of analyses of the rumen ingesta and preliminary experiments in vivo. Biochem. J. 37, 142-148.
- Pell A.N., Schofield P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. J. Dairy Sci. 76, 1063-73.
- Petre M., Zarnea G., Adrian P., Gheorghiu E. (1999). Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels. Res. Conserv. and Recy. 27, 309-332.
- Picque D., Perret B., Cleran Y., Corieu G. (1991). On-line ethanol estimation and prediction : application to the production of low alcohol wines. Proc. Biochem. 26, 173-178.
- Poole D.M., Hazlewood G.P., Laurie J.I., Barker P.J., Gilbert H.J. (1990). Nucleotide sequence of the *Ruminococcus albus* SY3 endoglucanase genes *celA* and *celB*. Mol. Gen. Genet. 223, 217-223.
- Poughon L. (2000). Modelling the liquefying compartment. Technical Note 45.3.
- Rajeshwari K.V., Panth D.C., Lata K., Kshore V.V.N. (1998). Studies on biomethanation of vegetable market waste Biogas Forum. 3, 4-11.
- Rajeshwari K.V., Panth D.C., Lata K., Kshore V.V.N. (2001). Novel process using enhanced acidification and USAB reactor for biomethanation of vegetable market waste. Waste Manage Res. 1, 192-300.
- Raven PH, Evert RF (2000). Biologie végétale, in De boeck (eds) Eichhorn SE, p 34-36 et 60-66.
- Raynal J, Delegenes JP, Moletta R (1998). Two-phase anaerobic digestion of solid waste by a multiple liquefaction reactors process. Bioresource Technol. 65, 97-103.
- Reguera G, Leschine SB (2001). Chitin degradation by cellulolytic anaerobes and facultative aerobes from soils and sediment. Microbiol. Letters 204, 367-374.
- Richard T.L. (1992). Municipal waste composting: physical and biological processing. Biomass Bioenergy. 3, 163-180.
- Roberton A., Glucina P.G. (1982). Fructose 6-phosphate phosphorylation in *Bacteroides* species. J. Bacteriol. 150, 1056-1060.
- Roger V., Fonty G., Komisarczuk-Bony S., Gouet P. (1990). Effects of physiochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens*

and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *Succinogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3081-3087.

Romano A.H., Eberhard S.J., Dingle S.L., McDowell T.D. (1970). Distribution of the phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system in bacteria. J. Bacteriol. 104, 808-813.

Ruiz I., Veiga M.C., Santiago P., Blázquez R. (1997). Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. Biores. Technol. 60, 251-258.

Rufener W.H., Nelson W.O., Wolin M.J. (1963). Maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. Appl. Microbiol. 11, 196-201.

Russell J.B. (1987). Effect of extracellular pH on growth and proton motive force of *Bacteriodes succinogenes*, a cellulolytic ruminal bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 53, 2379-2383.

Russel J.B., Baldwin R.L. (1979). Comparison of substrate affinities among several rumen bacteria: a possible determinant of rumen bacteria competition. Appl. Environ. Microbiol. 37, 531.

Saloheimo A., Henrissat B., Hoffrén A.M., Telemán O., Penttilä M. (1994). A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. Mol. Microbiol. 13, 219-228.

Scheifinger C.C., Wolin M.J. (1973). Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined culture of *Bacteroides succinogenes* and *Selonomonas ruminantium*. Appl. Microbiol. 26, 789-795.

Schellhorn H.E., Forsberg C.W. (1984). Multiplicity of extracellular β -(1-4)-endoglucanases of *Bacteroides succinogenes* S85. Can. J. Microbiol. 30, 930-937.

Schloss P.D., Walker L.P. (2000). Measurement of process performance and variability in inoculated composting reactors using ANOVA and power analysis. Process Biochem. 35, 931-942.

Schmidt O., Kerner-Gang W. (1986). Natural materials, in : Biotechnol Vol.8, H.J. Rehm, G. Reed (Eds.), VCH Publishers, Germany, p 557-582.

Schuchardt F. (2000). Composting of plant residues and waste plant materials. Biotechnol. 11, 102-125.

Schwarz W.H. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 634-649.

Séon J., Creuly C., Duchez D., Pons A., Dussap C.G. (2003). Degradation of plant wastes by anaerobic process using rumen bacteria. Water Sci. Technol. 48, 213-216.

Séon J., Creuly C., Dussap C.G. (2002). Production and characterization of substrate coming from *Fibrobacter succinogenes*. Technical note 2-300.

- Shah M.P., Reddy G.V., Banerjee R., Babu P.R., Kothari I.L. (2005). Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (*Phylosticta* spp. MPS-001 and *Aspergillus* spp. MPS-002). *Process biochem.* 40, 445-451.
- Sharma V.K., Caudill M., Fortuna F., Cornacchia G. (1997). Processing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting: Review. *Ener. Conv. Manag.* 38, 453-478.
- Skiadas I.V., Gaval H.N., Schimdt J.E., Ahring B.K. (2003). Anaerobic granular sludge and biofilm reactors. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 81, 36-66.
- Sliwinski B.J., Soliva C.R., Machmuller A., Kreuzer M. (2002). Efficacy of plant extracts rich in secondary constituent to modify rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101, 101-114.
- Smith D.C., Forsberg C.W. (1991). α -glucuronidase and other hemicellulase activities of *Fibrobacter succinogenes* S85 grown on crystalline cellulose or ball-milled barley straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3552-3557.
- Stelmachowski M., Jastrzębska M., Zarzycki R. (2003). In-vessel composting for utilizing of municipal sewage-sludge. *Appl. Ener.* 75, 249-256.
- Stewart C.S., Paniagua C., Dinsdale D., Cheng K.J., Garrow S. (1981). Selective isolation and characteristics of *Bacteroides succinogenes* from the rumen of a cow. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 504-510.
- Stewart C.S., Bryant M.P. (1988). The rumen bacteria, in: P.N. Hobson (ed). *The rumen microbial ecosystem*. 21-75. Elsevier Science Publishers. London.
- Stewart C.S., Flint H.J. (1989). *Bacteroides succinogenes* a cellulolytic anaerobic bacterium from the gastrointestinal tract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 433-439.
- Strom P.F. (1985). Identification of thermophilic bacteria in solid waste composting. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 906-913.
- Suler D.J., Finstein M.S. (1977). Effect of temperature, aeration and moisture on CO₂ formation in bench-scale, continuously thermophilic composting of solid waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 345-350.
- Takada G., Kawaguchi T., Sumitani J.-I., Arai M. (1998). Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of *Aspergillus aculeatus* no. F-50 cellobiohydrolase I (*cbh1*) gene. *J. Ferment. Bioeng.* 85, 1-9.
- Teeri T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15, 160-167.
- Thauer R.K., Jungermann K., Decker K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol.* 41, 100-180.
- Thomson J.A. (1983). Molecular biology of xylan degradation. *Microbiol. Rev.* 10, 65-82.

- Tien M., Tu C.-P.D. (1987). Cloning and sequencing of a cDNA for ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Nature*. 326, 520–523.
- Tognetti C., Mazzarino M.J., Laos F. (2007). Improving the quality of municipal organic waste compost. *Biores. Technol.* 98, 1067-1076
- Tolan J.S., Foody B. (1999). Cellulase from submerged fermentation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65, 42-66.
- Tomme P., Warren R.A.J., Gilkes N.R. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungus. *Adv. Microbiol. Physiol.* 37, 1-81.
- Trois C., Polster A. (2007). Effective pine bark composting with the Dome Aeration Technology. *Waste Management*. 27, 96-105
- VanderGheynst J.S., Gossett J.M., Walker L.P. (1997). High-solids aerobic decomposition: pilot-scale reactor development and experimentation. *Process Biochem.* 32, 361-375.
- Van Soest P.J. (1967). Use of detergent in the analysis of fibrous feed III. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 46, 829-835.
- Vercoe P.E., Finks J.L., White B.A. (1995a). DNA sequence and transcriptional characterization of a β -glucanase gene (*celB*) from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *Can. J. Microbiol.* 41, 869–876.
- Vercoe P.E., Spight D.H., White B.A. (1995b). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *celD* β -glucanase gene from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *Can. J. Microbiol.* 41, 27–34.
- Vercoe P.E., Gregg K. (1992). DNA sequence and transcription of an endoglucanase gene from *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* AR20. *Mol. Gen. Genet.* 233, 284–292.
- Verrier D., Ray F., Albagnac G. (1987). Two-phase methanization of solid vegetable wastes. *Biol. Wastes*. 22, 163-177.
- Viturtia A.M., Mata-alvarez J., Cecchi F. (1995). Two-phase continuous anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Res. Conserv. Recy.* 13, 257-267.
- Vuorinen A.H., Saharinen M.H. (1997). Evolution of microbiological and chemical parameters during manure and straw co-composting in a drum composting system. *Agri. Ecosys. Environ.* 66, 19-29.
- Wallace R.J. (1980). Cytoplasmic reserve polysaccharide of *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 630-634.
- Wallnofer P., Baldwin R.L., Stagno E. (1966). Conversion of ¹⁴C-labeled substrates to volatile fatty acids by rumen microbiota. *Appl. Microbiol.* 14, 1004-1010.
- Warren R.A.J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 183-212.

- Watanabe K., Kodama Y., Harayama S. (2001). Design and evaluation of PCR primer to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J. Microbiol. Methods* 44, 253-262.
- Weiland P., Rossi A. (1991). The start up, operation and monitoring of high rate treatment systems: discussers report. *Water Sci. Technol.* 24, 257-277.
- Weimer P.J. (1993). Effects of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose-fed continuous culture. *Arch. Microbiol.* 160, 288-294.
- Weimer P.J. (1996). Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *J. Dairy Sci.* 79, 1496-1502.
- Weimer P.J., Lopez-Guisa J.M., French A.D. (1990). Effect of cellulose fine structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2421-2429.
- Wells J.E., Russel J.B. (1994). The endogenous metabolism of *Fibrobacter succinogenes* and its relationship to cellobiose transport, viability and cellulose digestion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 471-476.
- Wells J.E., Russel J.B., Shi J.B., Weimer P.J. (1995). Cellodextrin efflux by cellulolytic ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* and its potential role in the growth of non adherent bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1757-1762.
- Wells J.E., Russel J.B. (1996a). The effect of growth starvation on the lysis of the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes*. *Environ. Microbiol.* 62, 1342-1346.
- Wells J.E., Russel J.B. (1996b). Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly? *J. Dairy Sci.* 79, 1487-1495.
- Wick M., Lebeault J.M. (2001). Pressure measurement to evaluate ethanol or lactic acid production during glucose fermentation by yeast or heterofermentative bacteria in pure and mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 687-692.
- Wick M., Vanhoutte J.J., Adhemard A., Turin G., Lebeault J.M. (2001). Automatic method for evaluating the activity of sourdough strains based on gas pressure measurements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 362-368.
- Wilson C.A., McCrae S.I., Wood T.M. (1994). Characterization of a beta-D-glucosidase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* with particular reference to attack on cello-oligosaccharides. *J. Biotechnol.* 37, 217-227.
- Wilson G.B., Dalmat D. (1986). Measuring compost stability. *Biocycle* 27, 34-37.

Wong K.K., Murray S.A., Lewisch S.A., Baxter M.K., Ridky T.W., Ulissi-DeMario L., Kozarich J.W. (1993). Molecular properties of pyruvate-formate-lyase activating enzyme. *Biochem.* 32, 14102-14110.

Wood T.M., Wilson C.A., McCrae S.I., Joblin K.N. (1986). A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *Microbiol. Lett.* 34, 37-45.

Wooley R., Ruth M., Glassner D., Sheehan J. (1999). Process design and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development. *Biotechnol.* 15, 794-803.

Wright J.D. (1988). Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chem. Eng. Prog.* 84, 62-74.

Wulff-Strobel C.R., Wilson D.B. (1995). Cloning, sequencing, and characterization of a membrane-associated *Prevotella ruminicola* B14 beta-glucosidase with cellodextrinase and cyanoglycosidase activities. *J. Bacteriol.* 177, 5884-5890.

Zhu H., Paradis F.W., Krell P.J., Phillips J.P., Forsberg C.W. (1994). Enzymatic specificities and modes of action of two catalytic domains of the XynC Xylanase from *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Bacteriol.* 176, 3885-3894.

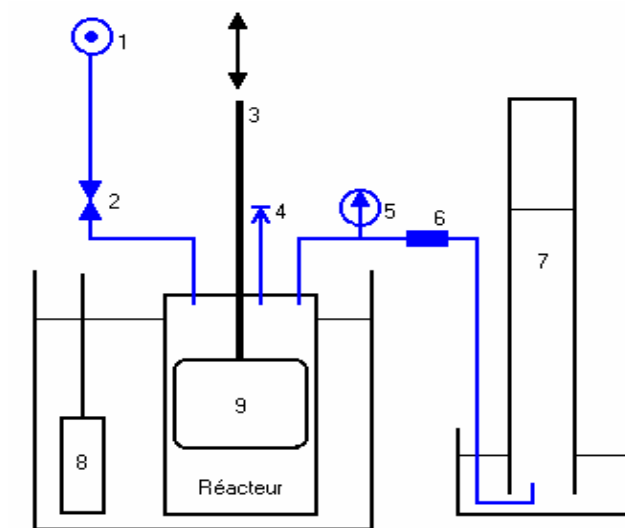
Zucconi F., DeBertoldi M. (1987). Compost specifications for the production and characterization of compost from municipal solid waste. *In: Compost: production and use.* Ed. De Bertoldi M., Ferranti M.P., L'Hermite, P. et F. Zucconi, Elsevier App. Sci., New York, p 351-358.

Références internet, dernière consultation le 17 Avril 2007 :

1. http://www.aquarium_hall.com
2. <http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/cellulose.gif>
3. <http://www.compostage.info>
4. <http://www.spuds.agron.ksu.edu/fq3.html>
5. ADEME (2006) Les déchets en chiffre : <http://www.ademe.fr/déchets>.

ANNEXES

ANNEXE 1 : CIRCUIT GAZ DU RUSITEC

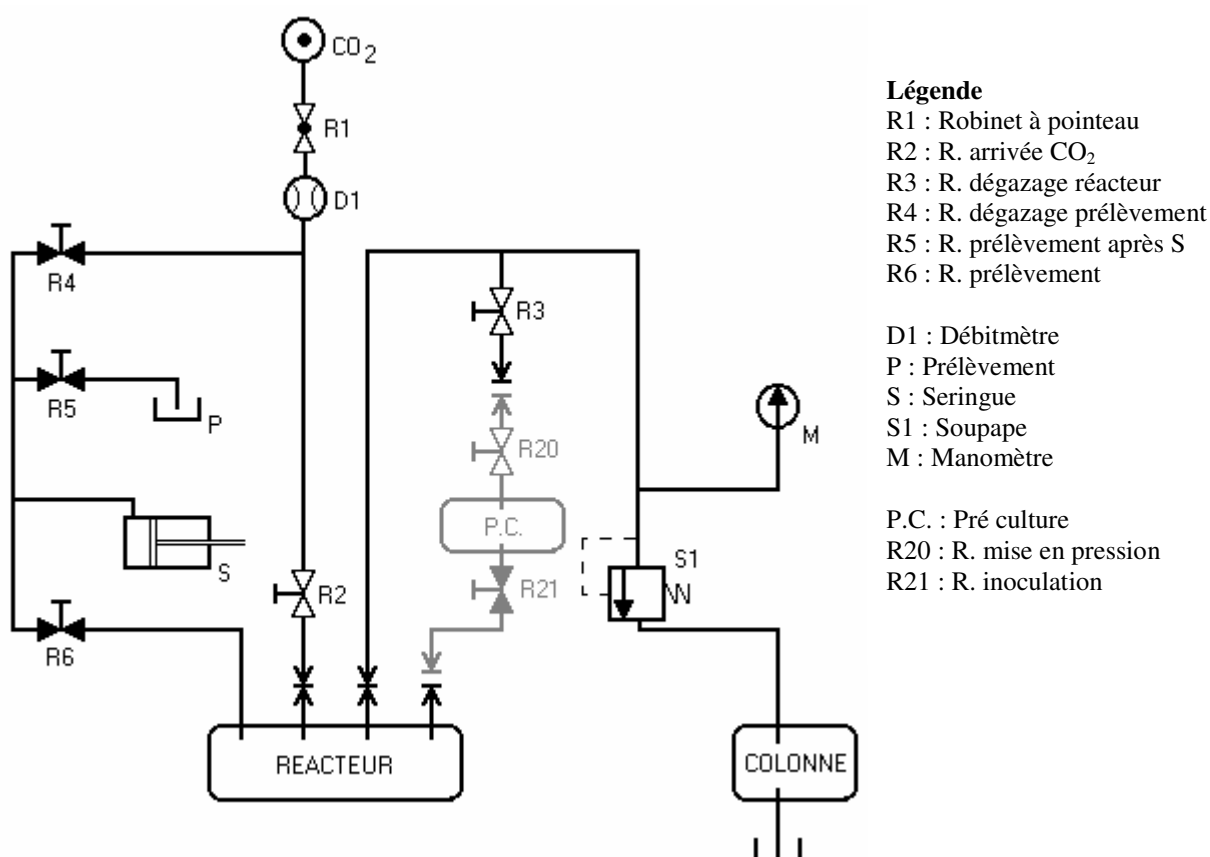


Légende

- 1 : Arrivée de CO₂,
- 2 : Vanne d'arrivée de CO₂,
- 3 : Tige d'agitation,
- 4 : Connexion d'inoculation,
- 5 : Manomètre,
- 6 : Soupape de maintien en pression,
- 7 : Colonne d'eau,
- 8 : Thermorégulateur,
- 9 : Nacelle contenant le substrat

ANNEXE 2 : PROTOCOLE D'INOCULATION DU RUSITEC

- Connecter le tuyau supérieur de l'erenmeyer (robinet R20) au réacteur (robinet R3)
- Connecter le tuyau inférieur de l'erenmeyer (robinet R21) au réacteur (connecteur supérieur libre du réacteur)
- Ouvrir les robinets R20 et R3
- Ouvrir le robinet de débit R1 pour obtenir une surpression d'environ 0,05 Bar
- Fermer le robinet R1
- Ouvrir le robinet R21, attendre l'inoculation complète de la pré-culture
- Fermer le robinet R21
- Fermer les robinets R3 et R20
- Déconnecter le connecteur supérieur du réacteur
- Déconnecter le tuyau supérieur de l'erenmeyer (après le robinet R3)



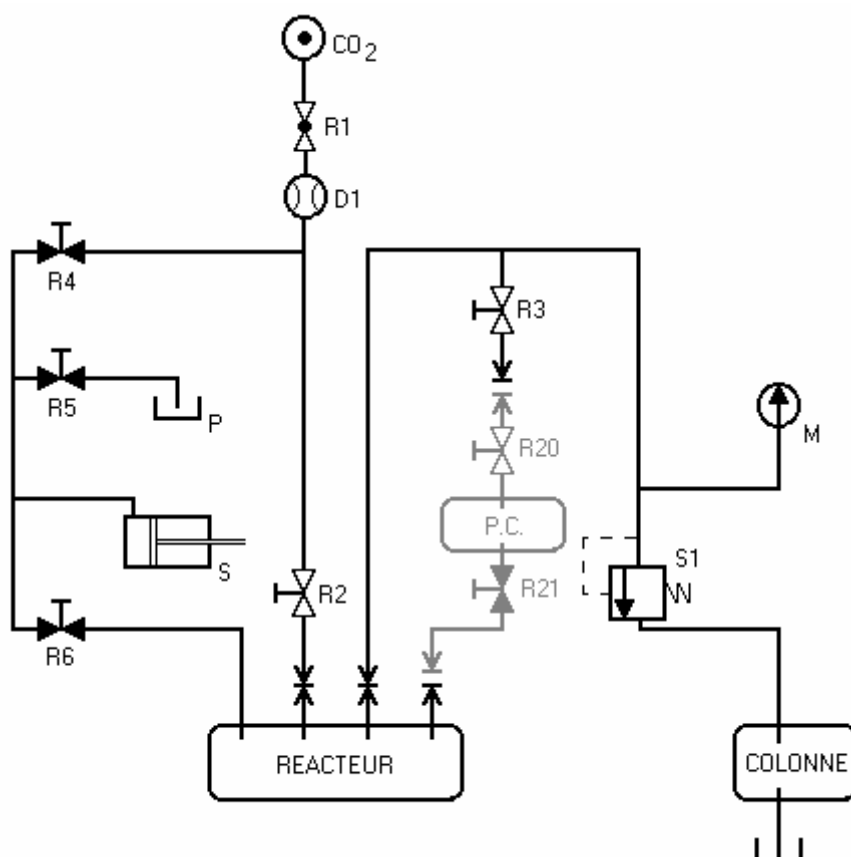
ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE PRELEVEMENT DU RUSITEC

Purge du circuit de prélèvement

- Ouvrir légèrement le robinet R4, puis le robinet R5, laisser quelques minutes
- Refermer le robinet R5 en maintenant la seringue
- Laisser la seringue se remplir à moitié de CO₂, puis fermer le robinet R4.

Prélèvement

- Ouvrir légèrement le robinet R6 en retenant la seringue
- Retourner la seringue vers le haut, lorsque 8ml ont été prélevé
- Purger le tuyau de prélèvement : le remplir complètement de CO₂ en comprimant la seringue sans perdre le prélèvement
- Fermer le robinet R6 en maintenant la seringue en position
- Ouvrir le robinet R5 et vider la seringue dans un contenant
- Fermer le robinet R5
- Purger le circuit de prélèvement.



Légende

R1 : Robinet a pointeau
 R2 : R. arrivée CO₂
 R3 : R. dégazage réacteur
 R4 : R. dégazage prélèvement
 R5 : R. prélèvement après S
 R6 : R. prélèvement

D1 : Débitmètre
 P : Prélèvement
 S : Seringue
 S1 : Soupape
 M : Manomètre

P.C. : Pré culture
 R20 : R. mise en pression
 R21 : R. inoculation

ANNEXE 4 : MILIEUX DE CULTURE POUR LA RECHERCHE DE CONTAMINANTS

Le milieu 869

Le milieu 869 est composé pour un litre de : 10 g de peptone, 5 g d'extrait de levure, 5 g de NaCl, 1 g de Glucose, 0,345 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Pour les milieux solides 1,5% d'agar sont ajoutés avant la stérilisation.

Le milieu 284

A 985 mL d'eau sont ajoutés 6,06 g de trisHCl, 4,68 g de NaCl, 1,49 g de KCl, 1,07 g de NH_4Cl , 0,43 g de Na_2SO_4 , 0,20 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2% de la source de carbone (glucose ou succinate), 4 mL d'une solution à 1% de Na_2HOP_4 , 10 mL d'une solution de Fe(III) NH_4 citrate (48 mg/100mL) et 1mL de solution trace SL7. Cette solution est composée de 1,3 mL de HCl à 25%, 144 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 62 mg de H_3BO_3 , 190 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 17 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 24 mg de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et 36 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Le pH est ajusté à 7,8 avec HCl ou NaOH. Pour les milieux solides 2% d'agar sont ajoutés.

Le milieu sistrom

918 mL d' H_2O avec 0,2% de la source de carbone sont stérilisés et pour les milieux solides 1,5% d'agar sont ajoutés avant la stérilisation. A cette eau stérile (environ 70°C) sont ajoutés 20 mL de solution C, 20 mL de phosphate de calcium (1 M), 5 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 10%, 20 mL de succinate de potassium à 10%, 2 mL d'acide L-glutamic à 5%, 4 mL d'acide L-aspartique à 1%, 10 mL de NaCl à 5%, 30 mg de L-cystéine et 1 mL d'une solution d'éléments traces. La solution C est composée de 10 g d'acide nitrilotriacétique, 29,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,835 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9,25 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 50 mg d'acide nicotinique, 25 mg de thiamine HCl et 0,5 mg de biotine, elle est ajustée à un pH de 6,8-7 à l'aide d'une solution 1 M de KOH. La solution d'éléments traces est composée de 1,097 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 250 mg d'acide tétra acétique éthylendiamine, 500 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 154 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 89,2 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 24,8 mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et 11,4 mg de H_3BO_3 .

ANNEXE 5 : AMORCES UTILISEES

Nom	Séquence (5'-3')	Position	Références
ALF968r	AAC GCG CAG AAC CTT ACC	968	Probebase ^a
BET42af	GCC TTC CCA CTT CGT TT	42	Probebase ^a
GAM42af	GCC TTC CCA CAT CGT TT	42	Probebase ^a
LGC354Ar	GCA GTA GGG AAT CTT CCA	354	Probebase ^a
LGC354Br	GCA GTA GGG AAT CTT CCG	354	Probebase ^a
LGC354Cr	GCA GTA GGG AAT CTT CGG	354	Probebase ^a
CBF286f	TCC TCT CAG AAC CCC TAC	286	Probebase ^a
CFB563f	GGA CCC TTT AAA CCC AAT	563	Probebase ^a
CFB719f	AGC TGC CTT CGC AAT CGG	719	Probebase ^a
CFB972r	CGA GGA ACC TTA CCA AGG	972	Probebase ^a
CFB1083f	TGG CAC TTA AGC CGA CAC	1083	Probebase ^a
CF319af	TGG TCC GTG TCT CAG TAC	319	Probebase ^a
Bac303f	CCA ATG TGG GGG ACC TT	303	Probebase ^a
Univ787R	TAC CAG GGT ATC TAA T	787	DasSarma and Fleischmann, 1995 ^b
Univ926Ar	CCG TCA ATT CCT TTA AGT TT	926	Muyzer <i>et al.</i> , 1996 ^c
Univ926r	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	926	Reysenbach and Pace, 1995 ^b
Univ9-27f	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G	9	Probebase ^a
Univ1406Ar	GAC GGG CGG TGT GTA CA	1406	Baker <i>et al.</i> , 2003
Univ1406Gr	GAC GGG CGG TGT GTG CA	1406	Reysenbach and Pace, 1995 ^b
Univ786f	GAT TAG ATA CCC TGG TAG	786	Probebase ^a
Univ529CfGC	GCC AGC CGC CGC GGT	529	Probebase ^a
Univ529AfGC	GCC AGC AGC CGC GGT	529	Probebase ^a
EUB515r	CCG TMT TTA CCG CGG CTG CTG GCA	515	Reysenbach and Pace, 1995 ^b
EUB338R	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	338	Probebase ^a
EUB1492r	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	1492	Probebase ^a
GC Celamp : 5' - CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG-3' est ajouté en 5' des amorces EUB63f, Univ529CfGC, Univ529AfGC et Univ9-27f GC. Muyzer <i>et al.</i> , 1996 ^c			

a : <http://www.microbial-ecology.net/probebase/>, b : Baker *et al.*, 2003, c ; Watanabe *et al.*, 2001.

PUBLICATIONS

Listes des publications et communications

Publications

Christophe G., Creuly C., Dussap C.G. (2007) Monitoring gas pressure as a growth parameter and as a degradation parameter, *en preparation*.

Christophe G., Creuly C. and Dussap C.G. (2005) Higher plant waste fiber degradation by biological treatment. *Proceedings of ICES-2005*, SAE international.

Bursens J., Verstraete W., Albrecht T., Brunner G., Christophe G., Creuly C., Dussap C.G., Lasseur C. (2005) A Total Converting and Biosafe Liquefaction Compartment for MELiSSA *Proceedings of ICES-2005*, SAE international.

Pons A., Cornet J.F., Duchez D., Creuly C., Christophe G. (2004) Monitoring of dissolved carbon dioxide in various bioprocesses using a new p_{CO_2} sensor. *Proceedings of ICBF-2004*, Asiatech Inc Publishers.

Notes techniques pour l'ESA

Christophe G., Creuly C., Dussap C. G.: The MAP Project: A total converting and biosafe liquefaction compartment for MELiSSA.

- Technical note 2.5: Characterization of *F.s.* unit mass balances (2004),
- Technical note 2.6: Optimization of the *Fibrobacter* unit: fermentation parameters (2004),
- Yearly report: *Fibrobacter succinogenes* a cellulolytic rumen bacterium (2005),
- Technical note 2.7: Optimization of the *Fibrobacter* unit: process parameters (2005),
- Technical note 2.8: HACCP-Analysis and testing of monitoring procedures (2005),
- Technical note 2.9: Modelling and demonstration (2006).

Creuly C., Christophe G., Cornet J. F. (2006) Test of NTE biomass scan system sensor. Technical note 83.4.

Higher plant waste fiber degradation by biological treatment

Gwendoline CHRISTOPHE, Catherine CREULY and Claude-Gilles DUSSAP

Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique, Université Blaise Pascal, BP206, 63174 Aubière cedex, France, phone 33 4 73407430, fax 33 4 73407829, e-mail dussap@univ-bpclermont.fr

Copyright © 2005 SAE International

ABSTRACT

This work concerns the degradation of waste plant materials by anaerobic digestion using a rumen bacterium: *Fibrobacter succinogenes* in a similar reactor as the first compartment of MELiSSA. The fermentation process is studied, both for engineering aspects and the metabolic response of the strain. The process is controlled by measurements of pH, redox, temperature and CO₂ pressure. During the fermentation it appears that *Fibrobacter succinogenes* is able to grow and to degrade all the solid substrates separately and allows an efficient degradation (59-64 %) of vegetable wastes, with a high production of acetate, butyrate (8 g/l of each), N-NH₃ (800 mg/l) and CO₂ (20 l). The results enable to quantify the so called liquefaction efficiency of the culture.

INTRODUCTION

In the MELiSSA (Micro-Ecological Life Support Alternative) project, the production of higher plants is supposed to provide the core of the food supply. The major drawback of such a strategy is that at least 50% of dry mass of vegetable produced in higher plant chamber is considered as non edible and therefore must be re introduced in the recycling system.

Microbial cellulases and hemicellulases are widely used in different industrial activities, such as in textile, detergent or brewery, and also in the treatment of domestic wastes and biological treatment of fibrous feeds in the non-ruminant livestock industry. However, these enzymes are not efficient for the degradation of highly lignified plant cell walls. The kinetics of digestion depends on the cross linking of cellulose fibers to other polymers like hemicellulose and lignin, the latter being difficult to degrade therefore protecting cellulose and hemicellulose against enzymatic hydrolysis (Selinger et al., 1996).

Ruminant animals possess rumen bacteria which developed a symbiotic relationship to digest lignocellulosic substrates (Hungate, 1950). *Fibrobacter succinogenes* is a major fibrolytic bacterium found in the rumens of cattle and sheep (Hungate, 1950). The enzymatic equipment of this bacterium explains these specific performances. Firstly, this bacterium degrades cellulose due to a very efficient cellulolytic system (Chesson and Forsberg, 1997). Cellulose is depolymerized at the bacterial surface by different cellulases and the released cellodextrins are hydrolysed to glucose and cellobiose in the periplasmic space. Secondly, it produces ferulic acids and acetylxylan esterases and arabinofuranosidases that are necessary to

cleave ester bonds linking hemicellulose to lignin, or to disbranch xylanases. Finally, several different xylanases and glucuronidases complete the cellulolytic system (Malburg et al., 1992).

This study focuses on the ability of *Fibrobacter succinogenes* to grow and to degrade several vegetable substrates: wheat straw, green cabbage, soya and a model of plant wastes comprising wheat straw, soya and green cabbage (1/3 DM of each). The efficiency of degradation is reported for each vegetable, including the assessment of the percentage of degradation of the different fractions of these plants (hemicellulose, cellulose, and lignin). The total production of volatile fatty acids and the rate of degradation are also determined.

MATERIAL AND METHODS

GROWTH CONDITION

Fibrobacter succinogenes S85 (ATCC 19169) was originally isolated from the bovine rumen (Bryant and Doestch, 1954) and has been maintained as a pure culture in laboratory ever since. It has been grown anaerobically under 100% CO₂ in a basal medium that contained (per litre) : 450 mg KH₂PO₄, 450 mg K₂HPO₄, 900 mg NaCl, 1.8 g (NH₄)₂SO₄, 90 mg MgSO₄, 90 mg CaCl₂, 3 mg MnSO₄ 6 H₂O, 0.3 mg CoCl₂ 6 H₂O, 8 mg FeSO₄ 7 H₂O, 0.25 mg biotin, 0.005 mg para-aminobenzoic acid (PABA), 0.01 mg hemin, a mixture of volatile fatty acids (VFA) (Gaudet et al., 1992) and carbon substrate.

CULTURE SYSTEM

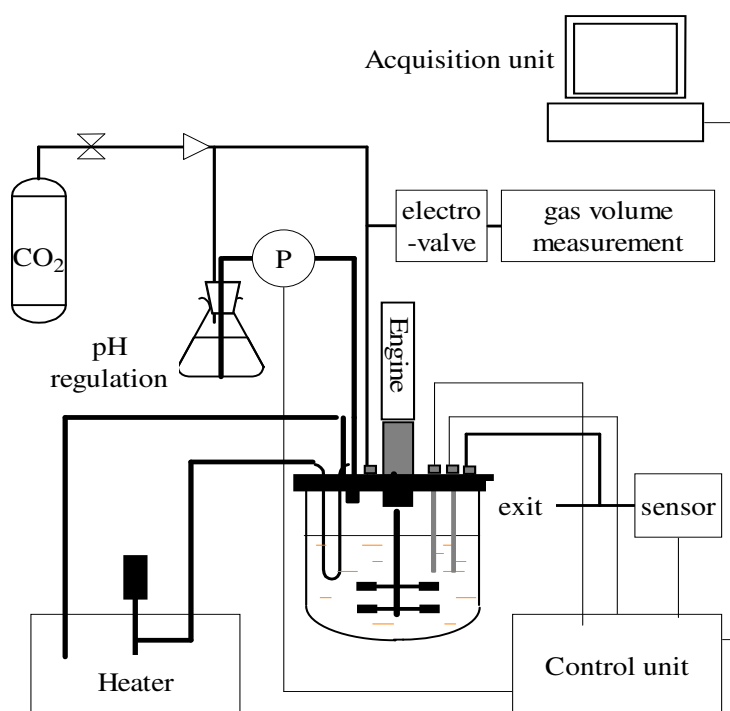


FIGURE 1: Representative scheme of the anaerobic reactor used to carry out the fermentation of vegetable wastes.

P: peristaltic pump, (—) electronic connections, (—) gas connections, (—) liquid connections.

Fibrobacter succinogenes was grown in a 5 L total volume reactor (SETRIC, France) with a working volume of 3.2 L. It was equipped with pH, redox potential (Ingold) and temperature probes (Figure 1), all connected to a control unit.

An absolute pressure sensor (JPB, France) was connected on the gas loop and related to the control and acquisition units.

An electro-valve (2 ways, PVDF, range 2 bars over atmospheric pressure) was also connected on the gas circuit in order to fit the specifications of the reactor concerning resistance to pressure. This electro-valve was first calibrated and programmed to be opened during 2.5 seconds each time that pressure in the reactor reaches 1.5 bars. This results in the reduction of pressure down to 1.15 bars.

On-line acquisition of these parameters was performed on a computer with an acquisition software. Data acquisition of each of these parameters was done every 4 minutes.

Temperature (regulation at 39°C by an external bath), rotation speed (100 rpm) and pH (6.0) were kept at constant values.

The pH regulation was performed with a 100 g/l Na_2CO_3 solution. This solution was connected to a peristaltic pump acted by the control unit. Each time pH value becomes less than 6.0, the pump starts and introduces the solution to the reactor.

The bottle and the reactor were also connected in order to ensure the solution introduced is perfectly anaerobic.

GENERAL INCUBATION PROCEDURE

2.8 L of media was introduced in the reactor with the carbon source and sterilized (20', 121°C). Cystein (0.5 g/l) and Na_2CO_3 (4 g/l) were introduced in the hot medium to decrease redox potential down to -350 mV and increase pH to values compatible to *Fibrobacter succinogenes* growth (6.0 - 6.5). Then, as

Fibrobacter succinogenes is a strictly anaerobic organism, the gas phase of the reactor was flushed overnight with CO_2 in order to completely remove oxygen from the atmosphere.

After these preparation steps, the reactor was inoculated with an overnight preculture (400 ml) grown on cellobiose (8 g/l). After inoculation, the reactor was closed with gas tight seals and the flush of CO_2 was then only connected for addition of new substrate and / or sampling of liquid phase.

CARBON SOURCE

The carbon and energy sources were composed by sterilized (20', 121°C) wheat straw, soya bean cake and green cabbage. Wheat straw and soya bean cake were ground in dry conditions in a blender. Fresh green cabbage was first cut in small parts and then ground in a kitchen mixer. All the substrates were mixed in order to increase the surface area for the cells attachment.

Two kinds of experiments were performed. The first concerns the degradation of each substrate separately. For that, the substrates were added separately (10 g/l DM) in the bioreactor. Each time that the pressure increase and the drop of pH were achieved, the process was stop to estimate the degradation rate. By this way 32 g of each substrate (wheat straw, cabbage and soya) were added and the culture was maintained respectively 30, 70 and 100 h.

The second kind of experiment concerns the degradation of a mixture of these three vegetables (wheat straw, cabbage and soya, 1/3 of each). The mixture was introduced in the initial culture media and then once a week 10 g/l DM were added. The process was maintained during about 1100 h including 6 additions of substrate. The total substrate added in the reactor during the culture is described in Table 1.

Substrates	DM (g)	Proportion (%)
Wheat straw	64	33
Soya	64	33
Cabbage	64	33

Table 1: Composition and quantity of solids substrates added.

All the additions were performed under CO₂ flux. Then, the pressure in the bioreactor was manually increased up to 1.15 bars in order to improve the bacterial growth.

ANALYTICAL PROCEDURES

Volatile fatty acids were determined by HPLC analysis. The apparatus (Agilent 1100, Agilent technology, Palo Alto, Calif.) was fitted with two columns (Rexex ROA 300x7.8 nm, Phenomenex, Torrance, Calif.) mounted in serial assembly in an oven (50°C) with a refractometer as detector. The mobile phase consisted of sulphuric acid in ultra-pure water pumped at 0.7 ml/min and 54 bars (5.4 MPa).

N-NH₃ concentration was measured in the liquid phase by the Patton and Crouch (1977) procedure.

After 30, 70 and 100 h of culture for the separate substrates and after 1100 h of fermentation for the mixture, all the content of

the reactor was centrifuged (15', 16400 g) to separate liquid and solid phases. The supernatants were kept and all the pellets containing the residues of fermentation were weighed. A part of these pellets was desiccated (heated vacuum desiccator, 24h, 60°C) and then weighed. A second part was re-suspended, filtrated, dried (24h, 110°C) and weighed. The supernatants were filtrated, dried (24h, 110°C) and weighed. Percentages of degradation were calculated at the same time by filtration and by desiccation for the total content of the reactor.

RESULTS AND DISCUSSION

RESULTS

Separate substrates experiments

Table 2 presents the results concerning the different parameters measured for individual substrate experiments.

Substrates	pH drop	Pressure increase (bar)	VFA production (g/l)	Degradation (%DM)	Time of culture (h)
Wheat straw	0.05	0.03	0.42	31.7	30
Cabbage	0.8	1.02	1.72	78.2	70
Soya	0.6	0.21	1.28	62.6	100

Table 2: Measured variables relevant for the characterization of the degradation separate vegetable substrates.

During the fermentation of wheat straw the drop of pH value was very slow. After 30 hours of culture, the pressure was increasing with the same slow rate. The kinetic of degradation of wheat straw by *Fibrobacter succinogenes* is slow and an efficient degradation takes probably a rather long time of culture.

On the contrary to wheat straw, the addition of cabbage is responsible for an important and rapid production of CO₂ and drop of pH. The kinetic of degradation of cabbage is clearly high and a degradation of the main part of this substrate could be obtained in only 60 hours.

The addition of soya results in an intermediary CO₂ production and drop of pH. The pressure increased from 1 to 1.3 bars in 90 hours. During the same time the drop of pH was 0.6 units.

Degradation of the mixed substrates

Monitoring of gas pressure

Figure 2 shows the evolution of gas pressure during the time course of the fermentation. On this figure, the cumulated pressure is represented; it is obtained by adding the pressure increases as if the valve were never opened. Pressure, which is manually increased to 1.2 bars just after substrate addition, decreases during few minutes because of chemical equilibrium between gaseous and

dissolved CO₂. Then, CO₂ production begins and is very important during about 10 hours.

After this first phase, gas production goes on but appears clearly slower until the next addition of fresh wastes. After each new solid substrate addition (black arrows on the figure), it is clearly observed that the production of gas is important during few hours (5 – 15h) before reaching a plateau. This production is around 1 to 2 bars for the four first batches

Also the efficiency of the process seems to slow down after 600 h of culture. The production of gas is 0.5 bars for the last two additions of substrates.

This separation in two phases may be explained by the degradation of two types of substrates: during a first step, the more easily degradable substrate (single sugars liberated by autoclave, cellulose with simple access...) is degraded, which allow a very quick kinetics of degradation and a very active metabolism of *Fibrobacter succinogenes*; then, the degradation of fibres of cellulose and hemicellulose, which are strongly cross-linked with lignin occurs. The kinetics of degradation of these substrates are clearly slower and this results in a deceleration of *Fibrobacter succinogenes* metabolism.

The total gas production during all the culture represents around 7 bars, which means about 20 litres of CO₂ in the reactor described in Figure 1.

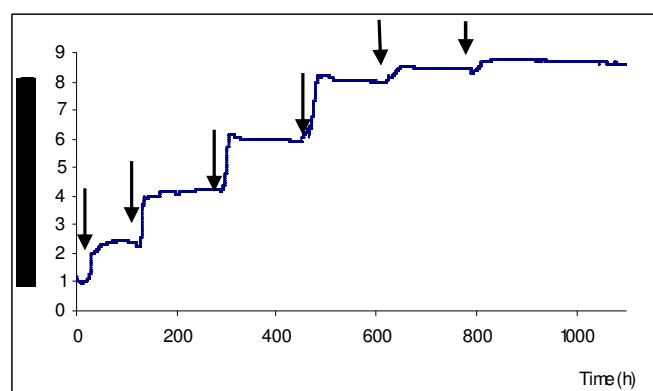


Figure 2: Evolution of cumulated pressure in the anaerobic reactor during 1100 h of culture of *Fibrobacter succinogenes* (→ : substrate additions).

VFA and N production

Figure 3 represents the evolution of metabolites concentration during the experiment. The first hours of culture are characteristic of *Fibrobacter succinogenes* metabolism with production of mainly succinate and acetate (1.2 g/l). All the succinate was reconsumed after 100 hours of culture and production of other VFA (butyrate and propionate) began. The evolution of acetate and butyrate concentration became linear and quite important. The final production of these

two metabolites after 1100 hours of culture was about 8 g/l each. The production of propionate decreases after 300 h of culture and its total production after 1100 h was 2.5 g/l. The total VFA production during all the experiment was around 20 g/l.

After a consumption of nitrogen source during the first hours of culture, a regular increase of nitrogen concentration is observed during the culture, probably due to the liberation of ammonium ions from vegetables wastes. The final N-NH₃ concentration is about 800 mg/l.

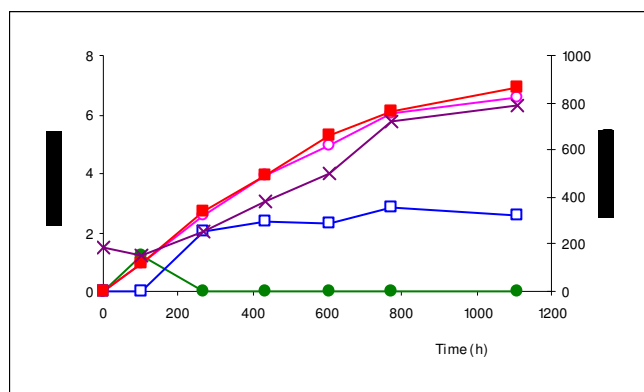


Figure 3: Time course evolution of succinate (●), acetate (○), butyrate (■), propionate (□) and N-NH₃ (×) during 1100h of a *Fibrobacter succinogenes* culture with fed-batch additions of substrates.

Degradation rate

All the content of the reactor was centrifuged (15', 13000g) and the liquid and solid phase were separated at the end of the cultures. The solids were dried (vacuum desiccation, 48 h, 60°C) and weighed. The global percentage of degradation estimated by dry mass measurement was 64%.

Table 3 shows the cell wall composition of the three vegetable substrates obtained by Van Soest analyses (Van Soest, 1967) related to the global degradation (DM) obtained with *Fibrobacter succinogenes*.

The results confirm the efficiency of *Fibrobacter succinogenes* when the substrates are vegetables.

Substrates	Hemicellulose (%DM)	Cellulose (%DM)	Lignin (%DM)	Total fibers (%DM)	Degradation (%DM)
Wheat straw	26	39	7	72	31.7
Cabbage	2	13	1	16	78.2
Soya	5	6	1	12	62.6

Table 3: Cell wall composition of the vegetable substrate determinate by the Van Soest method (1967) and efficiency of *Fibrobacter succinogenes* (Séon et al., 2003)

DISCUSSION

The metabolism of *Fibrobacter succinogenes* appears clearly more efficient for the degradation of cabbage than for soya and for wheat straw. This is confirmed by the global efficiency of degradation which is largely higher for cabbage. The two main reasons to explain these results are probably the size of the particles and the proportion of lignin in the substrates. The relationship between the lignin content and the apparent dry-matter loss established by Colling and Yokoyama (1980) is probably the major factor which explains that the kinetics of degradation of wheat straw is clearly lower. In wheat straw, the fiber part of cell walls represents more than 70% and the proportion of lignin is quite important (7%). These data are one of the explanations to the complexity of the degradation of this substrate. The complex and fibrous structure with a high proportion of undegradable lignin and attached hemicellulose makes wheat straw very difficult to degrade.

The fiber and lignin proportions are more similar for soya and for cabbage (12 and 16% respectively). Nevertheless, the proportion of hemicellulose is much more important for soya than for wheat straw. This is probably the reason why *Fibrobacter succinogenes* is more efficient to degrade cabbage than soya. Indeed, hemicellulose is a branched glucose polymer which participates to the complexity of the fibrous matrix. Therefore the enzymatic equipment necessary is more important for degrading hemicellulose than cellulose and a slower kinetics of degradation is obtained. Indeed, xylanases or disconnecting enzymes (Forsberg et al., 1994) allow the separation of hemicellulose and lignin from the rest of the matrix and lead to improve the degradation of hemicellulose (Mc Dermid et al., 1990).

The degradation rate of the mixture, which is intermediary, confirms the results obtained with the separate substrates. In spite of the high proportion of lignin due to the wheat straw, *Fibrobacter succinogenes* is able to degrade efficiently the mixture by synthesizing enzymes necessary to disconnect the hemicellulose from the lignin.

The second point is the size of the particles which are much more important for wheat straw than for the two other substrates. Indeed *Fibrobacter succinogenes* needs a narrow adhesion with the cell walls of the vegetables (Fields et al., 2000) to depolymerize cellulose and the use of shorter particles should probably improve the efficiency of the degradation.

CONCLUSION

In this study, an anaerobic reactor was designed and built with the aim of collecting new information about the ability of *Fibrobacter succinogenes* to grow and to degrade several vegetable substrates: wheat straw, green cabbage, soya and a model of plant wastes comprising wheat straw, soya and green cabbage (1/3 of each). The efficiency of degradation is reported for each vegetable, including the assessment of the percentage of degradation of the different fractions of these plants (hemicellulose, cellulose, and lignin). These results show that the degradation of the different substrates occurs differently and that the composition of the substrate in cellulose, hemicellulose and lignin is very important for the efficiency of *Fibrobacter succinogenes*. These results also show that *Fibrobacter succinogenes* is very efficient for the degradation of vegetable wastes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the European Space Agency and the MAP study, which has facilitated the carried work by their interest and financially support.

REFERENCES

- Bryant MP, Doestch RN (1954) A study of actively cellulolytic rod shaped bacteria of the bovine rumen. *J. Dairy Sci.* 37: 1176-1183.
- Chesson A and Forsberg CW (1997) Polysaccharide degradation by the rumen microorganisms, Hobson, PN, Stewart CS, the rumen microbial ecosystem, 2nd ed. Blackie Academic London, 329-381.
- Collings GF, Yokoyama MT (1980) Gas-liquid chromatography for evaluating polysaccharide degradation by *Ruminococcus flavefaciens* C94 and *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 566-571.
- Field MW, Mallik S, Russel JB (2000) *Fibrobacter succinogenes* S85 ferments ball-milled cellulose as fast as cellobiose until cellulose surface area is limiting. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 570-574.
- Forsberg CW, Gong J, Malburg Jr LM, Zhu H, Iyo A, Cheng KJ, Krell PJ, Philipps JP (1994) Cellulases and hemicellulases of *Fibrobacter succinogenes* and their roles in fibre digestion, In: K. Shimada *et al.* (ed.) Genetics, biochemistry and ecology of lignocellulose degradation. Unpublishers Co. Proceedings of the MIE Bioforum, Japan, p125-136.
- Gaudet G, Forano E, Dauphin G, Delort AM (1992) Futile cycle of glycogen in *Fibrobacter succinogenes* as shown by in situ ¹H NMR and ¹³C NMR investigation. *Eur. J. Biochem.* 207: 155-162.
- Hungate RE (1950) The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria, *Bacteriol.Rev.*, 14, 1-49.
- Malburg LM Jr, Tamblyn LJM, Forsberg CW (1992) Degradation of cellulose and hemicellulose by rumen microorganisms. In Microbial degradation of natural products. Edited by G. Winkelman VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, p127-159.
- McDermid KP, Forsberg CW, McKenzie CR (1990) Purification and properties of an acetyxylan esterase from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3805-3810.
- Patton CJ, Crouch SR (1977) Spectrometric and kinetic investigation of the Berthelot reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 49: 464-469.
- Selinger LB, Forsberg CW, Cheng KJ (1996) The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe* 2: 263-284.
- Seon J, Creuly C, Duchez D, Pons A, Dussap CG (2003) Degradation of plant wastes by anaerobic process using rumen bacteria. *Water Sci. Technol.* 48: 213-216.
- Van Soest PJ (1967) Use of detergent in the analysis of fibrous feed III. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* ; 1965, 46 : 829-835.

L'intérêt pour les biotechnologies de dégradation des déchets végétaux est de plus en plus important, aussi bien d'un point de vue environnemental que de santé publique. Les deux plus importantes technologies de dégradation s'appuyant sur des phénomènes biologiques sont la biométhanogenèse et le compostage. La biotechnologie développée ici s'appuie sur la capacité de dégradation du rumen des bovidés. En effet, les ruminants sont les animaux les plus performants pour dégrader les déchets végétaux grâce à une communauté microbienne très abondante et très efficace. Parmi ces micro-organismes, *Fibrobacter succinogenes* est l'espèce majeure. Elle possède un équipement enzymatique très complet et complexe qui permet de dégrader les végétaux. Ces potentialités peuvent donc être utilisées dans le cadre du développement d'une biotechnologie de dégradation de déchets végétaux et dans le cadre du projet MELiSSA qui vise à créer un écosystème clos artificiel.

Au cours de ce travail, un réacteur anaérobie a été mis au point pour la culture de *Fibrobacter succinogenes* S85. Dans un premier temps des cultures sur glucose ont été effectuées afin de valider les techniques utilisées. Ces cultures ont montré que notre procédé est valide pour *Fibrobacter succinogenes* mais également que le suivi de la croissance est possible par un suivi de l'augmentation de pression, due à la production de CO₂. Ceci nous permet donc de suivre la croissance dans des milieux plus complexes comme ceux contenant des végétaux.

La dégradation des déchets végétaux par *Fibrobacter succinogenes* a ensuite été effectuée. Le substrat est composé de chou, de tourteau de soja et de paille de blé, en mélange (1/3 de chaque) ou séparément. Ces cultures ont permis de mettre en évidence des cinétiques de dégradation différentes selon le substrat utilisé. L'explication est que la différence de composition des substrats (cellulose, hémicellulose et lignine) provoque, pour les substrats les plus riches en fibres, la synthèse d'enzymes plus spécifiques. Ensuite, la dégradation d'un substrat issue d'une première dégradation par biométhanogenèse, dans le cadre du projet MAP, a été réalisée. Ces cultures ont permis une amélioration du système et ont révélé des rendements de dégradation totaux (boucle MAP) importants.

La recherche d'un contaminant par biologie moléculaire a été menée pour expliquer la production de butyrate dans nos cultures. Les expériences effectuées ne permettent pas de conclure sur la présence d'un contaminant et d'autres expériences doivent être effectuées.

Enfin, toutes les fermentations effectuées ont été simulées grâce au programme "Anaerobic Waste Compartment Modelling and Simulation". Ces simulations montrent une très grande similitude avec les résultats expérimentaux et ce programme peut donc être utilisé pour prédire la dégradation de quantités plus importantes de substrat.

The interest for biotechnologies of vegetation waste degradation is increasingly significant, as well for an environmental point of view than a public health point of view. The two most important biotechnologies for vegetable degradation, based on biological events, are the biomethanogenesis and composting. The biotechnology developed in this study, is based on the efficiency of the rumen to degrade vegetables. Indeed, ruminants are the most efficient animals to degrade vegetable wastes thanks to a microbial community very abundant and very effective. Among these micro-organisms, *Fibrobacter succinogenes* is the major species. It has an enzymatic equipment very complete and complex which explain these capacities to degrade the vegetables. These potentialities can thus be used within the framework of the development of a biotechnology of degradation of vegetation wastes and within the framework of the MELiSSA project which aims to create an artificial closed ecosystem.

This study focused on the development of an anaerobic bioreactor for *Fibrobacter succinogenes* S85 cultures. First, cultures on glucose were carried out in order to validate the techniques used. These cultures showed that our process is valid for *Fibrobacter succinogenes* cultures. They also showed a link between VFA production, glucose consumption and gas pressure measurement. So the pressure could be used as a growth parameter especially when growth occurs on vegetables.

The degradation of the vegetation wastes by *Fibrobacter succinogenes* was then performed. The substrate was composed of cabbage, wheat straw and soya bean, in mixture (1/3 of each) or separately. These cultures showed different kinetics of degradation according to the substrate used. The explanation is that the difference in composition of the substrate (cellulose, hemicellulose and lignin) causes, for the substrate richest in fibres, the synthesis of more specific enzymes. Then, the degradation of a substrate from a first degradation by methanogenesis, within the framework of MAP project, was carried out. These cultures allowed an improvement of the system and revealed important total degradation yields (MAP loop).

The presence of a contaminant was verified by molecular biology in order to explain the production of butyrate in our cultures. With these experiments we can't conclude of the presence of a contaminant and other research must be performed.

Finally, all performed fermentations were simulated with the program "Anaerobic Waste Compartment Modelling and Simulation". These simulations show a very great similarity with the experimental results. So this program can be used to predict the degradation of a biggest quantity of substrate.